

Rhodophyceen- und Phaeophyceen- Phykokolloide als Träger charakteristischer Säurefunktionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
NABIL ABDELMESSIH
aus Kairo - V. A. R.

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Rhodophyceen- und Phaeophyceen-Phykokolloide
als Träger charakteristischer Säurefunktionen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Nabil A b d e l m e s s i h
aus
Kairo - V.A.R.



Berichterstatter: 1. Professor Dr. R. Springer
2. Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 11. 1965

Mikrokopie GmbH · München 22 · Bruderstraße 9

M E I N E N L I E B E N E L T E R N

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München in der Zeit vom April 1962 bis April 1965 durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von

Herrn Professor Dr. Rudolf S p r i n g e r ,
dem ich an dieser Stelle für die stete Anteilnahme und seinen Rat bei allen auftauchenden Fragen und Schwierigkeiten, sowie das menschliche Wohlwollen, das er mir während meines Aufenthaltes in Deutschland entgegenbrachte, meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Ebenso bringe ich Herrn Professor Dr. Eugen B a m a n n ,
Direktor des Institutes für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, für die wertvolle sachliche Unterstützung und die vielseitige Förderung meinen besonderen Dank zum Ausdruck.

INHALTSVERZEICHNIS :

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Ergebnisse der Untersuchungen	4
I. Die Carrageensäuren als Polysaccharide mit Schwefelsäureester-Gruppen als Säurefunktion .	4
II. Die Auffindung von Schwefelsäureester- Gruppen neben Carboxyl-Gruppen als Säure- funktion in Polysacchariden der Braunalgen ...	8
1. Schwefelgehalte der Phykokolloide ver- schiedener Braunalgen ermittelt nach verschiedenen Verfahren	9
2. Die Salzbildung der Alginsäure mit stick- stoffhaltigen organischen Basen	9
3. Charakterisierung der Polysaccharidsäuren der Algen	10
a) Ergebnisse papierchromatographischer Untersuchungen	10
b) Bestätigung der Ergebnisse papier- chromatographischer Untersuchungen durch die Dünnschichtchromatographie ...	13
c) Differenzierung acider Gruppen mit Hilfe der Papierelektrophorese	15
d) Differenzierung acider Gruppen mittels der Säulenchromatographie	17
e) Die Verteilung des aciden Wasserstoffs der Phaeophyceen-Phykokolloide auf die Säurefunktionen	21
III. Das Auffinden charakteristischer Absorp- tionsmaxima im I.R.Spektrum der Carrageena- te und Alginate	23
IV. Die heparinoide Wirkung der Algeninhalt- stoffe	30
V. Spaltbarkeit der Algenpolysaccharidschwefel- säureester durch tierische Sulfatase	34

VI.	Der Abbau von Polysaccharidschwefel- säureestern durch menschlichen Duode- nalsaft	36
VII.	Ausscheidung von Sulfat- und Esterschwe- fel im Harn nach peroraler Verabfolgung von Carrageen	37
C.	Auswertung und Diskussion der Ergebnisse	38
D.	Versuchsteil	48
I.	Beschreibung des Ausgangsmaterials	48
II.	Isolierung und Reindarstellung der Alginate	49
III.	Isolierung der Carrageenine	49
IV.	Darstellung der freien Säuren durch Ionenaustausch	50
V.	Analytisch-chemische und physikalisch- chemische Verfahren	50
	1. Schwefelbestimmungen	50
	2. Stickstoffbestimmung	51
	3. P_H -Messungen	51
	4. Papierchromatographische Untersuchungen .	51
	5. Dünnschichtchromatographische Unter- suchungen	52
	6. Papierelektrophoretische Untersuchungen .	52
	7. Säulenchromatographische Untersuchungen .	52
VI.	Darstellung der Salze organischer Basen	53
VI.	Versuchsanordnung bei der Aufnahme der Infrarotspektren	54
VIII.	Bestimmung der heparinoiden Wirkungen	54
IX.	Reinigung von Algenpolysaccharidschwefel- säureestern für die enzymatischen Unter- suchungen	56

	Seite
X. Gewinnung und Reinigung des Sulfa- tase-Präparates	57
XI. Methode der indirekten Bestimmung des enzymatisch abgespaltenen Sulfats	58
XII. Bestimmung der Schwefelbindungen im Harn	59
E. Zusammenfassung	60
F. Literaturverzeichnis	62

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

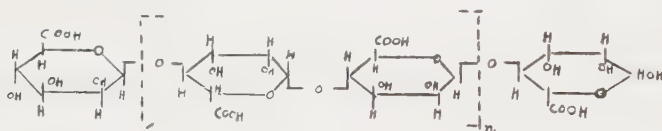
Obwohl Meeresalgen nachweislich seit mehr als zweieinhalb Jahrtausenden bei den Chinesen verspeist werden und auch heute noch besonders in Japan und ostasiatischen Küstengebieten in großem Maßstab als Nahrungsmittel im Gebrauch sind, hat eine Forschung auf diesem Gebiet erst verhältnismäßig spät eingesetzt. Im Jahre 1883 entdeckte und untersuchte als erster STANFORD (16) das sog. Algin. Seitdem haben sich viele Forscher - vor allem englische (12, 20, 21, 26) - mit dem Aufbau der Algininhaltsstoffe und der Aufklärung ihrer chemischen Struktur beschäftigt.

Die extrahierbaren Stoffe der Meeresalgen gehören zu den Polysacchariden im weiteren Sinne. Sie geben im wässrigen Milieu viskose Zubereitungen, in denen sie sich im kolloiden Zustand befinden. Als Bausteine sind neben Zuckern wie Galaktose, Glukose und Mannose solche ausfindig gemacht worden, die Säuregruppen, Carboxylgruppen oder Schwefelsäurereste tragen. Durch den Gehalt an derartigen Säurefunktionen unterscheiden sich die Alginpolysaccharide maßgeblich von der Stärke, Inulin und Glykogen. Sie ähneln auf Grund des Gehaltes an acidischen Gruppen, die im Naturprodukt in Salzform vorliegen, einer Pektin, Pflanzengummi und den Pflanzenschleimen, welche in vielen höheren Pflanzen anzutreffen sind.

STANFORD behauptete, daß in der von ihm untersuchten Alge *L. STENOPHYLLA* Stickstoff in Form basischer Aminogruppen vorläge, und brachte für den von ihm untersuchten und isolierten Inhaltsstoff die Summenformel $C_{76}H_{76}O_{22}(NH_2)_2$ in Vorschlag, aus der diese basische Funktion hervorging. Bereits im Jahre 1915 bestritten HOAGLAND und LIEB (30) die Anwesenheit von Stickstoff und machten für Inhaltsstoffe von Braunalgen die imperi-

sche Formel $C_{21}H_{27}O_{20}$ namhaft. Ihrer Anschauung schlossen sich NELSON²⁰ und andere Autoren an. (43)

HAAS und RUSSEL (28) haben als erste festgestellt, daß Schleimstoffe der Meeresalgen Säuregruppen tragen. Sie beschrieben ein "ätherisches, wasserlösliches Sulfat", das sie aus Laminaria-Arten isolieren konnten. - Die Kenntnis, daß Inhaltstoffe von Meeresalgen Carboxylgruppen als Säurefunktion tragen, verdanken wir vornehmlich HIRST und seinen Mitarbeitern. (29) Sie haben die Alginsäure als Polymannuronsäure erkannt und ihr folgende Strukturformel zugeschrieben:



Alginsäure

NELSON und Mitarbeiter (44) fanden jedoch bei der Untersuchung der Braunalge MACROCYSTIS PYRIFERA in den Extraktivstoffen Schwefel und vertraten die Anschauung, daß es sich bei dem von ihnen isolierten Inhaltsstoff um ein methylpentose - monosulfat - Polymeres mit der Bindungsform $(R-O-SO_3H)_n$ handle. Dieser Befund wurde später von mehreren Autoren angezweifelt.

Bis vor verhältnismäßig kurzer Zeit vertrat man die Ansicht, daß Braunalgen vorwiegend aus Uronsäuren aufgebaut sind und somit Carboxylgruppen als Säurefunktion tragen, während Rotalgen $S O_3 H$ -Reste aufweisen.

Der Gehalt an solchen aciden Gruppen ist für die Anwendung der Algen-Polysaccharide auf pharmazeutischen, lebensmittelchemischem und technologischem Gebiet von Bedeutung: So verleihen $S O_3 H$ -Gruppen den Carrageenaten blutgerinnungshemmende Eigenschaften. Den Lebensmittelchemiker und Ernährungsphysiologen interessiert dagegen z.B., ob Polysaccharidschwefelsäureester durch körpereigene Verdauungsfermente des Menschen und des Tie-

res abgebaut werden. Den Technologen beschäftigt die Herstellung definierter Salze wie Natriumalginat oder Ammonium-Carrageenat, da die Kationen auf die Viskositäten von Lösungen der Algin- oder Carrageensäuren einen maßgeblichen Einfluß ausüben.

Im Hinblick auf die Bedeutung und die noch weitgehende Unkenntnis der funktionellen sauren Gruppen von Polysacchariden der Meeresalgen ist es interessant, dahingehende Studien an definiertem, botanisch einwandfrei bestimmtem Ausgangsmaterial durchzuführen.¹⁾

1) Der Studiengesellschaft zur Erforschung von Meeresalgen, Hamburg, möchte ich an dieser Stelle für die Beschaffung des definierten Algenmaterials meinen herzlichen Dank aussprechen.

B.

ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

I. Die Carrageensäuren als Polysaccharide mit Schwefelsäureester-Gruppen als Säurefunktionen

Bei der Untersuchung exakt bestimmter Rotalgen überrascht der verhältnismäßig konstante Gehalt an Schwefel im Ausgangsmaterial, der zwischen 8.23 % und 8.50 % (bezogen auf Trockensubstanz) liegt (Tabelle 1). Dieser Befund ist umso interessanter, als mehrere Autoren (13, 14) die starken Umwelteinflüsse (Standort, Klima, Sammelzeit usw.) auf die Bestandteile von Rotalgen beschreiben. Die Gehalte an Gesamtschwefel liegen durchschnittlich um etwa 20 % höher als diejenigen, die SPRINGER und MIDDENDORF (52) im handelsüblichen Drogenmaterial aufgefunden haben.

Tabelle 1:

Schwefelgehalte verschiedener Rotalgen

Rot-Algen	Sammelort bzw. Herkunft	Sammelzeit *)	Schwefelgehalt %
Chondrus Crispus (gebleicht)	Frankreich	1959	8.23
Chondrus Crispus (Natur)	Portugal	1959	8.50
Gigartina Asicularis	Westafrika	1959	8.38
Gigartina Spec.	Argentinien	1959	8.35
Gigartina Chauvinii	Peru	1959	8.21
Gigartina Stellata	Portugal	1959	8.25

*) Die jahreszeitliche Sammelzeit ist unbekannt.

Die Möglichkeit der Gewinnung zweier verschiedener Carrageenine (Man versteht darunter das natürlich vorkommende Gemisch der Salze der Carrageensäuren) durch wässrige Extraktion von Carrageen auf kaltem oder heißem Wege ist bereits des öfteren beschrieben worden. Auch die hier untersuchten Rotalgen ergeben jeweils bei Kalt- bzw. Heißeextraktion unterschiedliche Fraktionen, die mit den von BEYLE als λ und K-Carrageenin bezeichneten vergleichbar sind. Die Phykokolloide der Kalt- und Heißeextraktion weisen unterschiedliche Gehalte an Schwefel auf (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Schwefelgehalte von kalt und heiß extrahierten Carrageeninen verschiedener Herkunft

Rot-Algen	Kaltextrakt %	Heißeextrakt %
Chondrus Crispus (gebleicht)	11.01	8.63
Chondrus Crispus (Natur)	10.98	8.92
Gigartina Asicularis	10.12	9.12
Gigartina Spec.	10.08	9.10
Gigartina Chauvinii	9.97	9.08
Gigartina Stellata	10.46	8.80

Versuchsanordnung S. 49, 50.

Mittels eines Kationenaustauschers, der mit Protonen beladen ist, lassen sich die den Carrageeninen entsprechenden Säuren gewinnen. Es handelt sich hierbei um star-

ke Säuren. So weist z.B. die Lösung, die bei Ionenaustausch einer 1 %igen Kaltextraktlösung von Gigartina Stellata resultiert, einen P_H -Wert von 2.68 auf, die entsprechende des Heiextraktes 2.72. Bei der maßanalytischen Bestimmung der freien Säuren, die in 1 g Carrageenin enthalten sind, ergibt sich eine Menge von 3.5 Millimol bzw. Milligramm-Äquivalenten Wasserstoff für die Kaltfraktion, von 2.85 für die Heißfraktion.

Unter der Voraussetzung, daß ein Grammatom Wasserstoffionen einem Grammatom Schwefel, vorliegend als $S O_3 H$ entspricht, errechnen sich die in Tabelle 3, Spalte 2, aufgeführten scheinbaren Schwefelgehalte. Sie zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den nach oxydativem Aufschluß als $S O_4$ ermittelten.

In Übereinstimmung mit SPRINGER und MIDDENDORF (52) werden bei den einzelnen Pflanzen ausnahmslos im Kaltextrakt höhere Schwefelgehalte ermittelt als im Heißextrakt. Die isolierten Carrageenine beinhalten mehr Schwefel als die Pflanze selbst.

Tabelle 3:

Schwefelgehalte von Kalt- und Heißcarrageeninen

Gewichtsanalytisch nach oxydativem Aufschluß als $-S O_4$ ermittelt (Spalte I) und berechnet aus dem maßanalytisch erfaßten aciden Wasserstoff als Bestandteil der Säurefunktion $-S O_3 H$ (Spalte II).

Rot-Algen	Kaltextrakt		Heißextrakt	
	Ergebnis d.gewichts- analyti- schen Be- stimmung %	Ergebnis der maß- analyti- schen Be- stimmung %	Ergebnis d.gewichts- analyti- schen Be- stimmung %	Ergebnis der maß- analyti- schen Be- stimmung %
Chondrus Crispus (gebleicht)	11.01	10.85	8.63	8.42
Chondrus Crispus (Natur)	10.98	10.82	8.92	8.85
Gigartina Asicularis	10.12	10.16	9.12	9.04
Gigartina Spec.	10.08	9.89	9.10	8.98
Gigartina Chauvinii	9.97	9.42	9.25	9.12
Gigartina Stellata	10.46	10.39	8.80	8.72

Versuchsanordnung S. 50.

Zu den Rotalgen gehören auch selbst gesammelte Gelidium-Arten, die der Mittelmeerküste bei Alexandria entstammen. Wegen ihrer Verwendbarkeit zur Herstellung von Agar-Agar werden die Inhaltstoffe zum Unterschied von den Carrageeninen der bisher erwähnten Rotalgen "Agaroiden" bezeichnet.

Bei der Extraktion mit heißem Wasser resultiert eine verhältnismäßig geringe Ausbeute an Schleimstoffen, die nur 1.55 % Schwefel in der Trockensubstanz und somit einen Bruchteil im Vergleich zu Carrageenin aufweisen.

II. Die Auffindung von Schwefelsäureestergruppen neben Carboxylgruppen als Säurefunktion in Polysacchariden der Braunalgen

Bei der Untersuchung einiger botanisch definierter Braunalgen konnten folgende Schwefelgehalte ermittelt werden (Tabelle 4):

Tabelle 4:

Schwefelgehalte verschiedener Braunalgen

Braun-Algen	Sammelort bzw. Herkunft	Sammel- zeit *)	Schwefel- gehalt %
Laminaria Spec.	Island	1959	1.57
Lessonia Fusca	Argentinien	1959	1.73
Macrocystis Pyrifera	Argentinien	1963	1.61
Fucus Vesiculosus	Ostsee	1963	3.60
Fucus Vesiculosus	Arzneibuch- droge	unbe- kannt	3.15

*) Die jahreszeitliche Sammelzeit ist unbekannt

Versuchsanordnung S. 49, 50.

Beim Fucus Vesiculosus fallen mehr Schleimstoffe an, als bei den anderen untersuchten Braunalgen, sodaß der Schwefelgehalt der Phykokolloide nicht über dem anderer Braunalgen-Polysaccharide liegt.

Die Ergebnisse der Sulfatbestimmung nach Salzsäurehydrolyse und oxydative Aufschluß liegen in gleicher

Größenordnung. Nach der Veraschung wird wesentlich weniger Sulfat ermittelt, jedoch etwas mehr als die Hälfte.

HAAS (26) beobachtete bereits, daß der Sulfatgehalt des Hydrolysates etwa doppelt so hoch ist wie derjenige der Asche, wenn ein Schwefelsäureester vorliegt.

Tabelle 5:

1. Schwefelgehalte der Phykokolloide verschiedener Braunalgen ermittelt nach verschiedenen Verfahren

<u>Braun-Algen</u>	<u>Schwefelgehalte</u>		
	nach		
	Oxyoativem Aufschluß	Hydrolyse	Veraschung
Laminaria Spec.	5.34	5.68	3.2
Lessonia Fusca	3.47	3.24	2.3
Macrocystis Pyrifera	5.73	5.48	3.05
Fucus Vesiculosus	5.78	5.63	3.12
Fucus Vesiculosus (Droge)	5.61	5.57	3.05

Versuchsanordnung S. 50.

2. Die Salzbildung der Alginsäure mit stickstoffhaltigen organischen Basen

Die aciden Gruppen ($-S O_3 H$, $-COOH$) der Algenpolysaccharide bilden, wie R. SPRINGER und MIDDENDORF beschrieben haben, mit stickstoffhaltigen organischen Basen Salze. (52) Zunächst werden die Lösungen der Alginsäuren durch Kationenaustauscher hergestellt. Alkohol-

sche Lösungen wasserunlöslicher Alkaloidbasen (z.B. Atropin) setzen sich mit wässrigen Alginsäurelösungen in äquivalenten Mengen um. Hierbei treten sowohl die $-SO_3H$ - als auch die $-COOH$ -Gruppen in Funktion. Das Alginat der organischen Base kann also unter schonenden Bedingungen gewonnen werden. Die Salze sind beständig und bilden zunächst weiche, biegsame Filme, bei vollständigem Wasserentzug entstehen spröde Schuppen. Da die Säuren der Braunalgen, wie auch eigene Untersuchungen lehren, keinen Stickstoff enthalten, ergibt das in den Salzen organischer Basen ermittelte atomare Verhältnis von Stickstoff zu Schwefel Aufschluß über die Verteilung der genannten Säurefunktionen. Es beträgt z.B. bei dem Atropinsalz die Säure, die aus Laminaria Spec. gewonnen werden konnte, 5.7 : 1 bei einem Stickstoffgehalt von 5.25 % und einem Schwefelgehalt von 2.073 %. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Codeinsalz der Säuren der Braunalge Macrocystis Pyrifera. Hier stehen 6.72 % N 4.53 % S gegenüber, entsprechend einem Verhältnis 3.4 : 1.

3. Charakterisierung der Polysaccharidsäuren der Algen

a) Ergebnisse papierchromatographischer Untersuchungen

Die papierchromatographische Untersuchung der durch Ionenaustausch gewonnenen freien Säuren vermittelt im Falle von Lessonia Fusca, Laminaria Spec. und Macrocystis Pyrifera insofern ein einheitliches Bild, als unter den gewählten Bedingungen nur eine Substanz mit dem RF-Wert von etwa 0.17 dargestellt werden kann. Einen Fleck mit dem gleichen RF-Wert liefert auch die als Vergleichssubstanz herangezogene Säure der Rotalge Chondrus Crispus, die den Kaltcarrageenin zu Grunde liegt.

Ein hiervon abweichendes Verhalten kann bei Fucus vesiculosus beobachtet werden: Es resultieren bei der gleichen Versuchsanordnung zwei Flecke, von denen der eine den auffallend niedrigen RF-Wert der Säuren der übrigen Braunalgen aufweist, während der des anderen 0.36 beträgt.

Die chemische Analyse der mittels der Papierchromatographie dargestellten bzw. getrennten Substanzen führt zu dem Ergebnis, daß die Säuren mit dem niedrigen RF-Wert schwefelhaltig sind, während in dem zweiten ebenfalls mittels Bromkresolgrünlösung darstellbaren Stoff mit dem RF-Wert 0.36 Schwefel nicht nachweisbar ist.

Es verfügt demzufolge Fucus vesiculosus über zwei trennbare Substanzen, von denen die eine $-S O_3 H$ -Gruppen als Säurefunktion trägt.

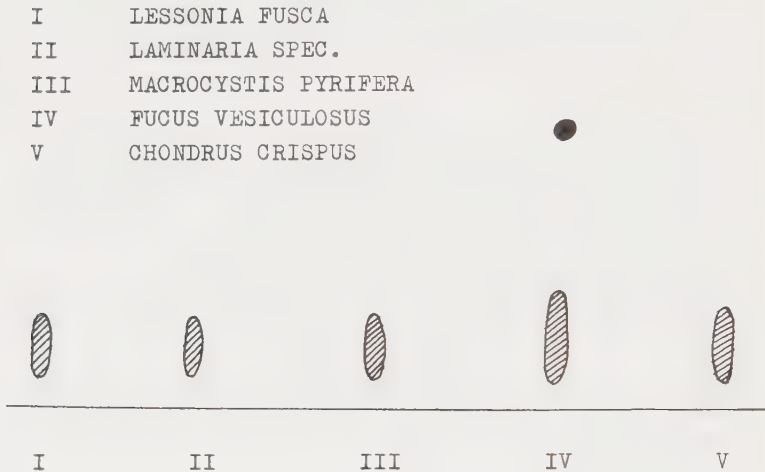
Die Darstellung bzw. Trennung der Inhaltstoffe der Braunalgen gelingt in dem von F. BROWN sowie LANG und Mitarbeiter (11) vorgeschlagenen alkalischen Milieu nicht mit der erwünschten Schärfe. Die Salze entfernen sich nur sehr schlecht vom Startpunkt, oder die Flecken zeigen bei Erhöhung des Wassergehaltes der verschiedenen Fließmittel Verwaschungen.

Es bewährt sich eine Mischung von n-Butanol / Benzylalkohol / Ameisensäure (85 %ig) / Wasser im Verhältnis von 7/7/1/2.

Als ungeeignet sind hier hingegen die Benzoesäureester Mischungen (15) sowie Butanol / Eisessig / Wasser, oder neutrale und nahezu neutrale Lösungsmittel wie z.B. wässrige Phenole erkannt worden.

Abbildung 1:

Papierchromatographische Darstellung der
Säuren isolierter Phykokolloide



Versuchsanordnung S. 51.

Tabelle 6: (zu Abbildung 1)

RF-Werte der untersuchten Substanzen

Algen	RF - Werte
Lessonia Fusca	0.17
Laminaria Spec.	0.16
Macrocystis Pyrifer	0.16
Fucus Vesiculosus	0.18, 0.36
Chondrus Crispus	0.16

b) Bestätigung der Ergebnisse papierchromatographischer Untersuchungen durch die Dünnschichtchromatographie

Auch mit Hilfe dieses Verfahrens sind die Säuren der Braunalgen gut darstellbar. Die RF-Werte weisen eine sehr gute Übereinstimmung mit den bereits im zurückliegenden Abschnitt genannten auf. Bei Fucus vesiculosus ist wiederum der zweite Fleck vorhanden, der sich schon deutlich in seiner kugeligen Form von den übrigen unterscheidet.

Hinsichtlich des Schwefelgehaltes der Substanzen kann ebenfalls Übereinstimmung mit den Ergebnissen der papierchromatographischen Untersuchungen bestätigt werden.

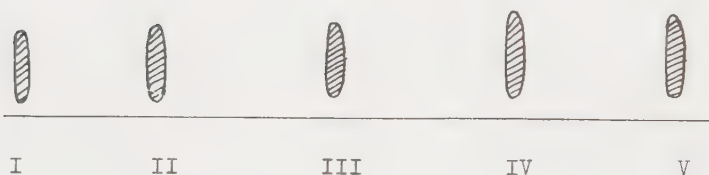
Bei Verwendung von Kieselgel gelingt die Trennung bei Fucus vesiculosus nicht, im allgemeinen ist eine geringe Tendenz zur Wanderung zu verzeichnen.

Als stationäre Phase hat sich Cellulosepulver bewährt, als mobile Phase das gleiche Gemisch, das bei der Papierchromatographie Verwendung fand.

Abbildung 2:

Dünnschichtchromatographische Darstellung der
Säuren isolierter Phykokolloide

- I LESSONIA FUSCA
- II LAMINARIA SPEC.
- III MACROCYSTIS PYRIFERA
- IV FUCUS VESICULOSUS
- V CHONDRUS CRISPUS



Versuchsanordnung S. 52.

Tabelle 7: (zu Abbildung 2)

RF-Werte der Säuren verschiedener Algen

Algen	RF - Werte
Lessonia Fusca	0.18
Laminaria Spec.	0.16
Macrocystis Pyrifera	0.17
Fucus Vesiculosus	0.18, 0.45
Chondrus Crispus	0.17

c) Differenzierung acider Gruppen mit Hilfe
der Papierelektrophorese

Ein charakteristisches Verhalten der wiederum mittels Kationenaustausches gewonnenen Säuren der Phaeophyceen und Rhodophyceen beobachten wir bei der papierelektrophoretischen Untersuchung: Offensichtlich hängt hier die Entfernung vom Startpunkt im besonderen Maße von der Säurefunktion ab. Die Polysaccharidsäuren der Rhodophyceen und Phaeophyceen wandern auf Grund der Eigenschaften, die ihnen die $-\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppe verleiht, im Verlaufe von drei Stunden etwa 5.0 cm vom Startpunkt. Hierbei zeigen die Carrageensäuren, die doch einen weitaus höheren Gehalt an Schwefel aufweisen als die der Braunalgen, eine nur unwesentlich größere Tendenz zur Wanderung. Ihre Entfernung vom Startpunkt beträgt im Durchschnitt 5.1 cm. Der Schwefelgehalt dieser Verbindungen ist jeweils nachweisbar.

Bei Fucus vesiculosus bleibt die zweite Substanz am Startpunkt. Ein Vergleich mit Pektinsäure lehrt, daß auch diese im elektrophoretischen Feld nicht wandert, sodaß angenommen werden darf, daß zwischen diesen beiden Stoffen, die sich in ihrem Aufbau ähneln, auch Übereinstimmung in der Säurefunktion vorliegt.

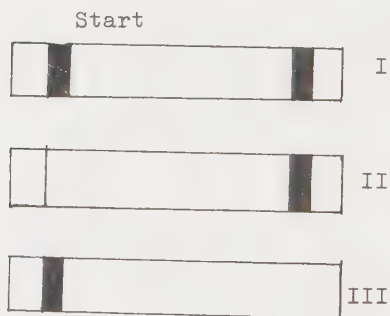
Es war interessant zu beobachten, daß die Wanderungstendenzen der Säuren bei der Papierelektrophorese gerade im Gegensatz zu denjenigen bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie steht. Es wandern unter den hier gewählten Bedingungen überhaupt nur die schwefelhaltigen Verbindungen, welche bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie nahe dem Startpunkt verbleiben.

Bei der Erprobung der verschiedenen Pufferlösung mit unterschiedlichen P_H -Werten gelingt es in keinem Falle, die Pektinsäure oder die Algeninhaltsstoffe, die ein der Pektinsäure ähnliches Verhalten aufweisen, von der Stelle auf der sie aufgetragen werden, zu entfernen.

Abbildung 3:

Verhalten der untersuchten Substanzen bei der Elektrophorese

- | | | |
|-----|-------------------|---------------|
| I | FUCUS VESICULOSUS | |
| II | CHONDRUS CRISPUS | (Kaltextrakt) |
| III | PEKTINSÄURE | |



Versuchsanordnung S. 52.

d) Differenzierung acider Gruppen mittels der
Säulenchromatographie

Die untersuchten Algensäuren weisen ein verschiedenartiges Verhalten gegenüber dem Adsorbens Cellulose auf, sodaß diese zur Trennung von Algenpolysacchariden mit unterschiedlichen Säurefunktionen geeignet ist. Trägt man den Säuregehalt des in kleinen Anteilen aufgefangenen Eluats in ein Koordinatensystem ein, dessen Ordinate den Säuregehalt und die Abszisse den Anteil des Eluats anzeigen, so resultieren bei manchen Säuren normale Kurvenbilder, die Anstieg und Abfall aufweisen.

Ein solcher Kurvenverlauf wird z.B. bei K-Carrageenin (Abb. 5) und bei den Säuren die Lessonia Fusca oder Laminaria Spec. zu Grunde liegen beobachtet. Bringt man jedoch die Säuren eines Gesamtauszuges von Carrageen (Kalt- und Heißfraktion) zur Sorbtion, so weist das Eluat zwei Maxima auf, im Kurvenverlauf sind zwei Peaks erkennbar (Abb. 6).

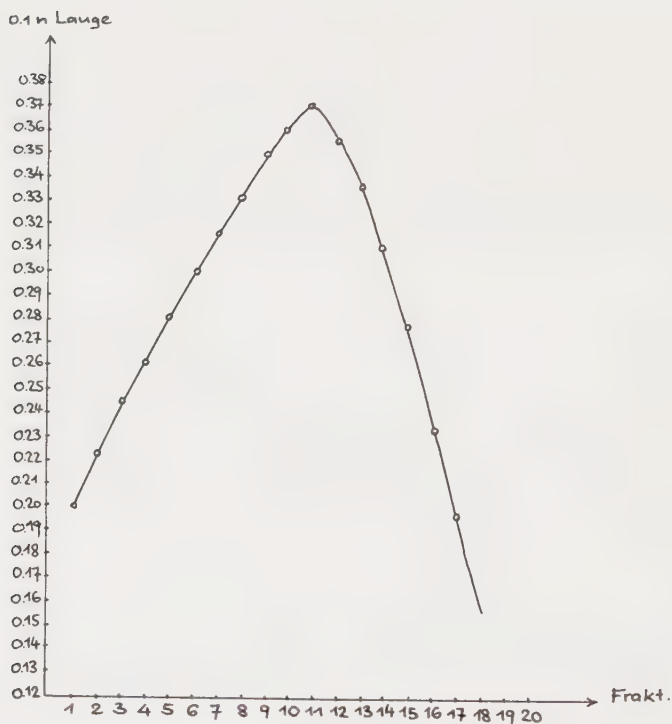
Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Anwendung der Säuren, die den Schleimstoffen von Fucus vesiculosus zu Grunde liegen (Abb. 7). Die Trennung zweier Säuren ist hier jedoch wesentlich schärfer als beim Carrageen-Gesamtextrakt.

In den ersten 9 ml. des Eluats, die dem ersten Kurvenanstieg- und Abfall entsprechen, ist kein Schwefel nachweisbar. In den folgenden 9 ml. ist dagegen Schwefel enthalten.

Abbildung 5:

Das Sorptionsverhalten der Säure des Kaltcarrageenins

Säuregehalt des in Anteilen von 2 ml. aufgefangenen Eluats



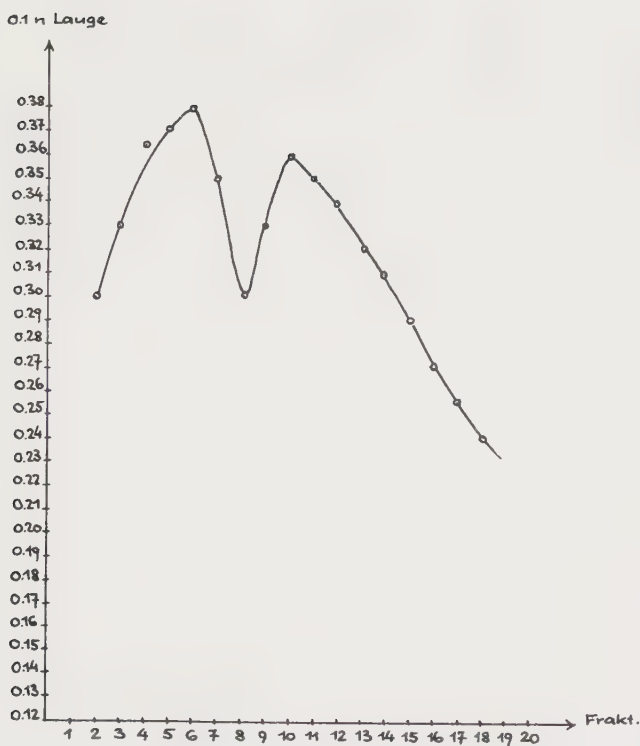
K. CARRAGEENIN

Versuchsanordnung S. 52

Abbildung 6:

Das Sorptionsverhalten der Säuren des Carrageen-
Gesamtextraktes (kalt und heiß)

Säuregehalt des in Anteilen von 2 ml. aufgefangenen Eluats

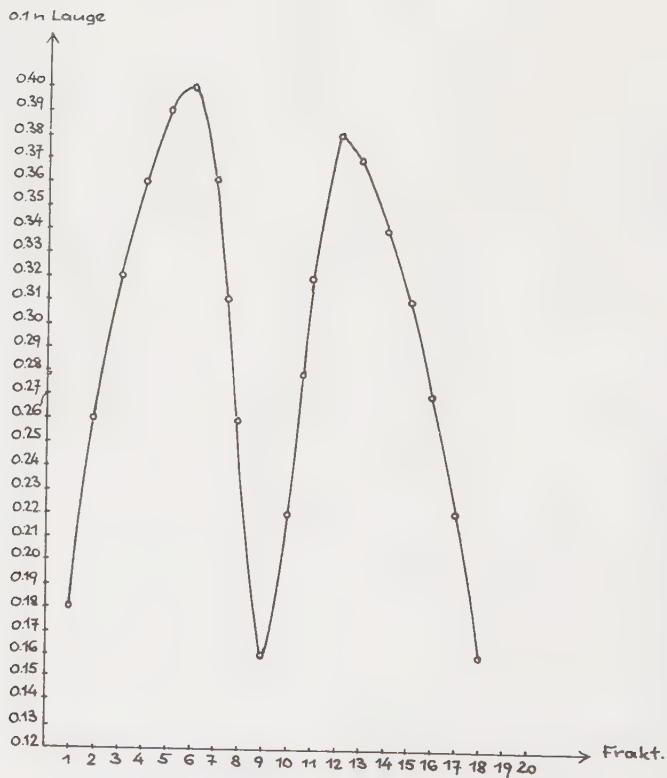


K.u.H. CARRAGEENIN

Abbildung 7:

Sorptionsverhalten der Säuren der Schleimstoffe von
Fucus Vesiculosus

Säuregehalt des in Anteilen von 2 ml. aufgefangenen Eluats



FUCUS VESICULOSUS

e) Die Verteilung des aciden Wasserstoffs der Phaeo-
phyceen-Phykokolloide auf die Säurefunktionen

Die bisher beschriebenen Untersuchungsergebnisse haben, wie in der Diskussion noch ausführlicher zu erörtern sein wird, ergeben, daß in Braunalgen $\text{-SO}_3\text{H}$ - und -COOH -Gruppen als Säurefunktionen vorliegen.

Da der Schwefel der in reiner Form dargestellten Algenpolysaccharidsäuren nachgewiesenermaßen ausschließ-lich in der Bindungsform $\text{-SO}_3\text{H}$ vorliegt, ergeben sich für den dem Schwefel zugehörenden sauren Wasserstoff folgende Anteile (Tabelle 8). Die Tabelle vermittelt gleichzeitig eine Bilanz der Verteilung des aciden Wasserstoffs auf $\text{-SO}_3\text{H}$ - und -COOH -Gruppen.

Tabelle 8:

Verteilung des aciden Wasserstoffs der Phaeophyceen-Phykokolloide auf die Säurefunktionen

Algen	Schwefel	Bezogen auf gesamten aciden Was- serstoff	Wasserstoff als Anteil der SO_3 H-Funktion		Restlicher Wasserstoff als Anteil der Carboxyl- Gruppen	
			in der Algen- säure	Bezug auf gesamten Was- serstoff	in der Algen- säure	Bezug auf gesamten aciden Was- serstoff
Macrocyrtis Pyrifera	5.73	0.531	0.179	33.5	0.352	66.5
Laminaria Spec.	5.34	0.533	0.177	33.2	0.356	66.8
Lessonia Fusca	3.47	0.335	0.108	32.2	0.227	67.8
Fucus Vesi- culosus	5.78	0.537	0.181	33.7	0.356	66.3

III. Das Auffinden charakteristischer Absorptions- maxima im I.R. Spektrum der Carrageenate und Alginate

Die Infrarotspektren der untersuchten Carrageenate und Alginate weisen gemeinsame charakteristische Absorptionsmaxima auf, die durch Ähnlichkeiten im Molekülbau (Polysaccharidstruktur) bedingt sind.

Kennzeichnend sind besonders Maxima bei 820 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} und 3400 cm^{-1} . Das Spektrum des Kaltcarrageenins zeigt im Prinzip den gleichen Kurvenverlauf wie das des Heißcarrageenins, lediglich die Absorptionen in den Bereichen 700 cm^{-1} und 925 cm^{-1} sind beim Heißcarrageenin ausgeprägter.

Die Braunalgen zeigen außerdem eine deutliche Absorption im Bereich von 1400 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} .

Die Deutung dieser Kurvenbilder erfolgt im Rahmen der Diskussion.

Abbildung 8:

Infrarotspektrum des isolierten Schleimstoffes
von Fucus Vesiculosus

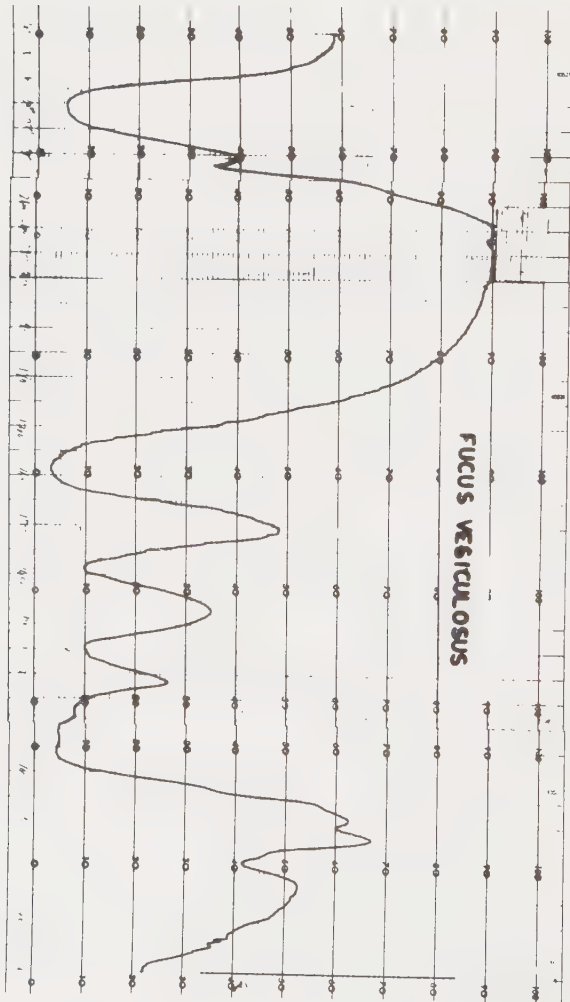


Abbildung 9:

Infrarotspektrum des isolierten Schleimstoffes
von Laminaria Spec.

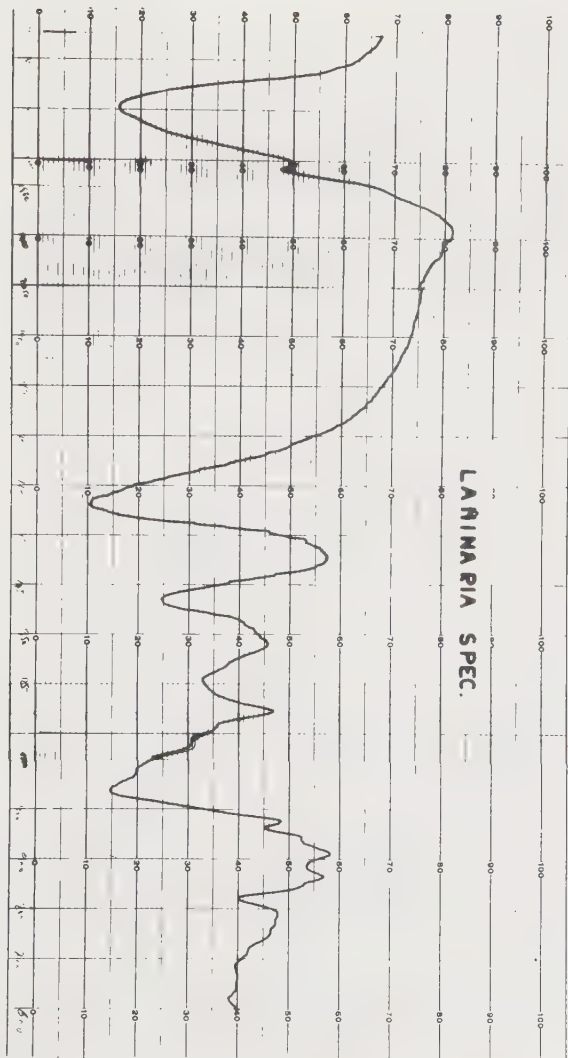


Abbildung 10:
Infrarotspektrum des isolierten Schleimstoffes
von Lessonia Fusca

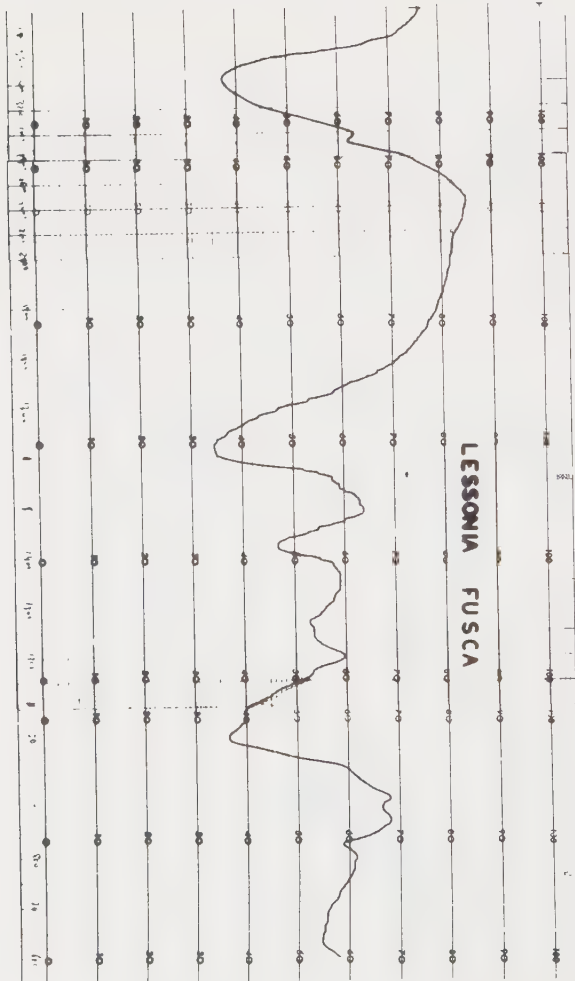


Abbildung 11:

Infrarotspektrum des isolierten Schleimstoffes
von Macrocystis Pyrifera

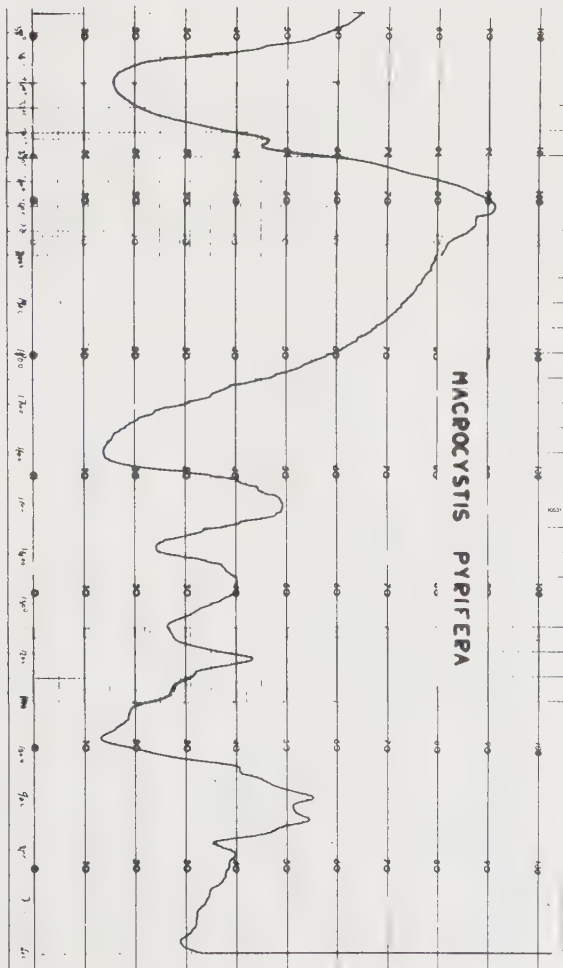


Abbildung 12:

Infrarotspektrum des Kaltcarrageenins

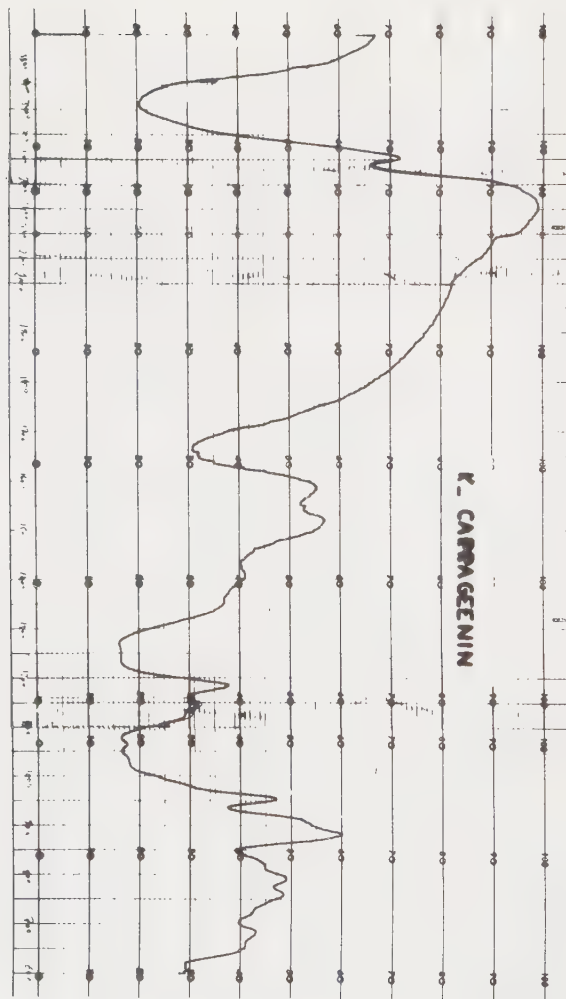
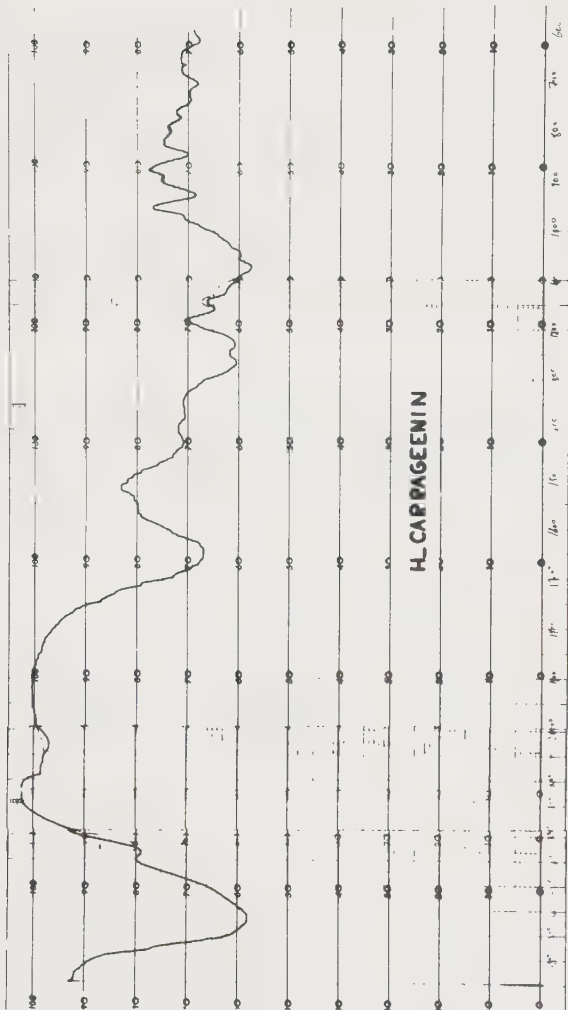


Abbildung 13:

Infrarotspektrum des Heicarrageenins



IV. Die heparinoide Wirkung der Algeninhaltsstoffe

Die untersuchten Algenpolysaccharide - auch die der Braunalgen - weisen eine heparinoide Wirkung auf. Als Bezugseinheit wird Heparin gewählt, das der Anforderung der U.S.P. XVI entspricht.

Die chemische Verwandtschaft des Heparins, das ein Polysaccharidschwefelsäureester mit einem Schwefelgehalt von 9.5 % ist, zu den Algenpolysacchariden geht auch aus den Ergebnissen papier- und dünn-schichtchromatographischer Untersuchungen hervor (Abb. 13). Die RF-Werte liegen in derselben Größenordnung, eine Ausnahme macht auch hier wieder Fucus vesiculosus bei dem zwei Substanzen nachweisbar sind. AWE bemerkte bei Heparin und manchen Heparinoiden wie Chondroitinschwefelsäure und sulfuriertem Heparin das Auftreten eines zweiten Flecks, den er nicht deuten konnte.

Abbildung 13:

Papierchromatographische Darstellung von Heparin und Algen-Heparinoiden

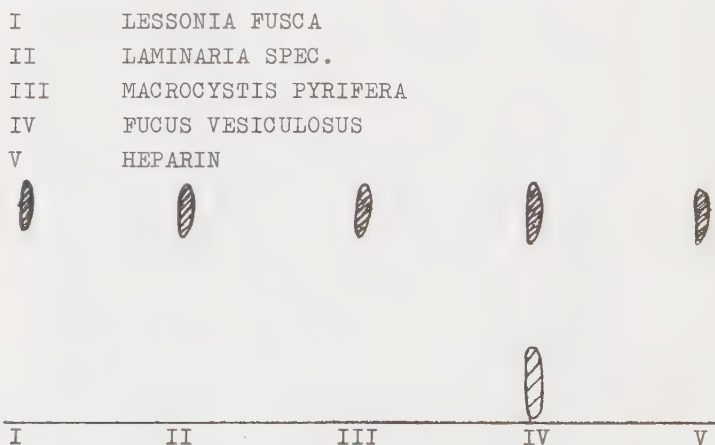


Tabelle 9: (zu Abbildung 13)

RF-Werte des Heparins und der Algen-Heparinoide

Untersuchtes Material	RF	Werte
	Papierchromato- graphie	Dünnschichtchro- matographie
Lessonia Fusca	0.94	0.85
Laminaria Spec.	0.93	0.80
Macrocystis Pyrifera	0.95	0.85
Fucus Vesiculosus	0.94, 0.14	0.83, 0.35
Heparin	0.95	0.86

Im vorliegenden Falle gelangen zum Unterschied von früher beschriebenen Versuchsanordnungen nicht die freien Säuren, sondern die natürlich vorkommenden Salzgemische zur Anwendung. Auch das Fließmittelgemisch ist ein anderes, so daß sich Chromatogramme ergeben, die von den in Abbildung 1 und 2 dargestellten stark abweichen.

Das dem Heparin ähnliche Verhalten der Algen-Heparinoide zeigt sich nicht nur bei der papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchung, sondern auch im biologischen Test: Die Hemmung der Aktivität der Ribonuklease, die als Maß für die heparinoide Wirkung herangezogen wird, ist in allen Fällen nachweisbar (Tabelle 10).

Tabelle 10:

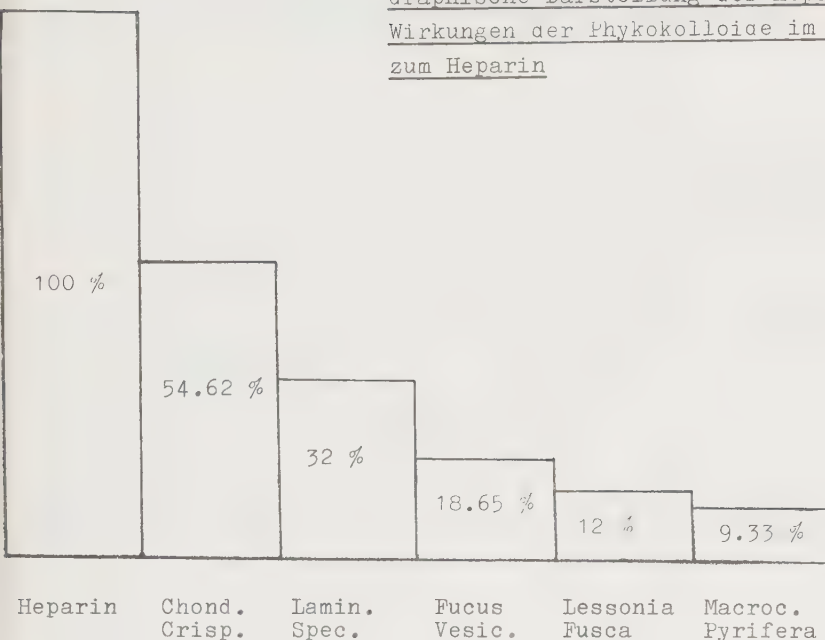
Hemmung der Aktivität der Ribonuklease durch Algen-
Heparinoide als Kriterium ihrer heparinoiden Wirkungen

(Heparin = 100 %)

Zeit Min.	Heparin	Chond. Crisp.	Lamina- ria	Fucus	Lesso- nia	Macro- cystis
1	9.3 %	4.0 %	0.0 %	6.6 %	0.0 %	1.3 %
2	18.5 %	9.3 %	8.0 %	8.0 %	0.0 %	1.3 %
3	28.0 %	16.0 %	11.7 %	9.3 %	1.3 %	2.6 %
4	61.3 %	22.6 %	12.2 %	10.3 %	8.0 %	3.8 %
5	68.0 %	28.0 %	14.6 %	12.0 %	8.6 %	5.3 %
6	73.3 %	33.3 %	16.0 %	13.3 %	9.3 %	6.6 %
7	80.0 %	40.0 %	18.6 %	13.7 %	9.7 %	7.2 %
8	89.3 %	45.3 %	21.3 %	14.6 %	10.6 %	8.0 %
9	100 %	54.62%	32.0 %	18.65%	12.0 %	9.33%

Abbildung 14:

Graphische Darstellung der heparinoiden
Wirkungen der Phykokolloide im Vergleich
zum Heparin



Versuchsanordnung S. 54, 55.

V. Spaltbarkeit der Algenpolysaccharidschwefel-
säureester durch tierische Sulfatase

Die C-O - S Bindung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Schwefelsäureester der Rhodophyceen und Phaeophyceen wird ausnahmslos durch ein Sulfatasepräparat, das aus Schweineniere hergestellt worden ist, angegriffen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen spaltet diese Sulfatase bei einem P_H -Wert von 5.0, der in der Literatur als Optimum bezeichnet wird, (42, 53), etwa 90 % des Schwefelsäureesters der isolierten Inhaltstoffe der Rotalge Chondrus Crispus, bei der Verwendung der Braunalge Fucus Vesiculosus jedoch nur 66.33 %.

Die Änderung des P_H - Wertes, z.B. P_H 7, bedingt eine starke Abnahme der Enzymaktivität (Tabelle 11).

Tabelle 11:

Spaltbarkeit von Algenpolysaccharid-schwefelsäure-
estern durch Sulfatase aus Schweineniere

Substrat	Estersulfat (berechnet als SO_4) %	abgespalte- nes SO_4 %	Anteil des abgespalt. Sulfats %
<u>Versuchsreihe I</u> $\text{pH} = 5.0$			
Kalt-Carrageenin	34.70	31.24	90.01
Heiß-Carrageenin	26.60	24.07	90.70
Phykokolloide von Fucus vesiculosus	15.60	10.34	66.33
<u>Versuchsreihe II</u> $\text{pH} = 7.0$			
Kalt-Carrageenin	34.70	18.04	53.05
Heiß-Carrageenin	26.60	12.06	45.4
Phykokolloide von Fucus vesiculosus	15.60	5.30	34.5

Versuchsanordnung S. 57, 58.

VI. Der Abbau von Polysaccharidschwefelsäureestern
durch menschlichen Duodenalsaft

Menschlicher Duodenalsaft weist unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei den Untersuchungen unter Verwendung eines tierischen Sulfatasepräparates Anwendung fanden, eine nicht wesentlich geringere Fähigkeit auf, die Polysaccharidschwefelsäureester des Carrageens zu spalten, als die Schweineniere-Sulfatase. Während 24 Stunden wird bei Einhalten eines P_H -Wertes von 5.0 die Esterbindung beim unverzweigten Carrageenin zu 84.5 % gelöst, beim verzweigt-kettigen Heißcarrageenin zu 72.2 %.

Tabelle 12:

Die Spaltung der Algenpolysaccharidschwefelsäure-
ester durch menschlichen Duodenalsaft

Substrat	Estersulfat (berechnet als SO_4) mg / 100mg	Aus 100 mg abgespalte- nes SO_4 mg	Anteil des abgespalt. Sulfats %
Kalt-Carrageenin	34.70	29.35	84.5
Heiß-Carrageenin	26.6	19.20	72.2

VII. Ausscheidung von Sulfat- und Esterschwefel im
Harn nach peroraler Verabfolgung von Carrageen

Bei Verzehr von 10 g Carrageen, das den Anforderungen des Arzneibuches entspricht und einen Schwefelgehalt von 7.8 % aufweist, kommt es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Bindungsformen des Harnschwefels.

Innerhalb 24 Stunden werden ausgeschieden:

Anorg. Sulfat-Schwefel = 380.8 mg,
entsprechend 1163.2 mg SO_4

Ester-Sulfat = 19.2 mg,
entsprechend 58.8 mg SO_4

Neutral-Schwefel = 14.0 mg.

Versuchsanordnung S. 59.

C. AUSWERTUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Im Hinblick auf die Unsicherheit, die im Handel befindliches Material, etwa Drogen des Arzneibuches, hinsichtlich ihrer Herkunft aufweisen, sind vorliegende Resultate der Untersuchungen definierter Ausgangsmaterialien von Interesse:

Die in hohem Reinheitsgrad dargestellten Säuren, die den Carrageeninen der einwandfrei bestimmten Rotalgen Chondrus Crispus, Gigartina Asicularis, Gigartina Spec., Gigartina Chauvinii und Gigartina Stellata zu Grunde liegen, enthalten Schwefel ausschließlich in der Bindungsform $-SO_3 H$. Es wird damit der Befund von SPRINGER und MIDDENDORF bestätigt, die bei Untersuchungen verschiedener Proben der im Arzneibuch aufgeführten Droge Carrageen, die laut DAB.6 den Stammpflanzen Chondrus Crispus und Gigartina Stellata entstammt, feststellen, daß der darin enthaltene Schwefel "nahezu ausschließlich in der Bindungsform saurerer Schwefelsäureester vorliegt". Die Polysaccharidsäuren der z.B. aus Portugal (Chondrus Crispus) oder Westafrika (Gigartina Asicularis) stammenden Rotalgen enthalten jedoch sowohl in der Kaltfraktion als auch in der Heißfraktion etwa 20 % mehr $-SO_3 H$, als die oben genannten Autoren ermittelten.

Die Konstitution der Rhodophyceen-Phykokolloide ist durch zahlreiche Arbeiten erforscht worden. Mittels der klassischen Methoden der Zuckerchemie sowie auf chromatographischem Wege konnte sichergestellt werden, daß die Carrageenine hauptsächlich aus d- Galaktoseeinheiten bestehen, die in α , 1,3-Stellung miteinander verknüpft sind und jeweils eine $SO_3 H$ -Gruppe aufweisen sollen.

Daß jedoch Rhodophyceen-Phykokolloide nicht immer einen dieser Forderung entsprechenden hohen Schwefelgehalt aufweisen, lehren die Befunde der Untersuchung einer Mischung von ägyptischen Gelidium-Arten, in der Gelidium pusillum überwiegt. Ein solches Material dient der Agar-Agar Gewinnung. Es stehen hier 1.55 % Schwefel den 11.01 % im Chondrus Crispus gegenüber.

Von JONES und PEAT (35) wird das Agarmolekül als eine Kette von neun β 1,3 verbundenen d- Galaktopyranose-Einheiten, die durch 1,4-Bindung noch ein Molekül L-Galaktose binden, das seinerseits wieder am C₆ mit Schwefelsäure verestert ist, beschrieben. Aus der Formulierung errechnet sich ein Schwefelgehalt von 1.8 %. Der eigene Befund (1.55 % Schwefel) steht mit dem von JONES und PEAT postulierten in gewisser Übereinstimmung. Wir lehnen die Verallgemeinerung von JONES und PEAT jedoch ab, da zur Gewinnung von Agar-Agar mehr als 50 Stammpflanzen angewendet werden, die sich offensichtlich durch die Zusammensetzung ihrer Inhaltstoffe unterscheiden. Allein im Schwefelgehalt etlicher Agarproben liegen Schwankungen zwischen 0.5 % bis 7.67 % vor.

Bei der Untersuchung einiger taxonomisch definierter Braunalgen wurde wider Erwarten ein nicht unbeträchtlicher Schwefelgehalt ermittelt. Eine der Ostsee entstammende Probe von Fucus vesiculosus erweist sich als besonders schwefelreiche Braunalge. Es konnte etwa doppelt soviel Schwefel ermittelt werden wie in Laminaria, Lessonia und Macrocystis-Arten. Ausnahmslos ist jedoch nur ein Bruchteil des Schwefels, den die Rotalgen enthalten, in Braunalgen auffindbar, im Durchschnitt 20 % bei Fucus vesiculosus etwa 40 %.

Im Rahmen der Untersuchungen, die darauf abzielen festzustellen, ob dieser Schwefel Bestandteil extrahierbarer

Algenpolysaccharide und in der Bindungsform $-\text{SO}_3 \text{ Me}$ bzw. $-\text{SO}_3 \text{ H}$ Anteil einer Säurefunktion ist, sind folgende Befunde beweiskräftig: Zunächst ist bemerkenswert, daß im Gegensatz zu den untersuchten Rotalgen bei Extraktion des Braunalgenmaterials in der Kälte und in der Wärme keine unterschiedlichen Extraktivstoffe resultieren. Anhand einer Ionenaustauschreaktion konnte festgestellt werden, daß der Schwefel, der-ähnlich wie bei den Rotalgen-im isolierten Schleimstoff angereichert ist, als Bestandteil einer organischen Verbindung vorliegt: Während nämlich anorganisches Sulfat von einem Anionenaustauscher in der OH-Form zurückgehalten wird, durchläuft das als $-\text{SO}_3 \text{ H}$ an Polysaccharide gebundene die Austauschersäule. Das vollständige Wiederfinden des Schwefels im Filtrat ist beweisend für seine organische Bindungsform. Durch Säurehydrolyse läßt sich ein Sulfatrest abspalten, der auf die Anwesenheit eines sauren Schwefelsäurerestes hindeutet.

Die mittels Kationenaustausches hergestellten freien Polysaccharidsäuren der Braunalgen weisen einen beträchtlichen Gehalt an aciden Gruppen auf. Es sei hier das Beispiel Lessonia Fusca angeführt: Einem Gramm des isolierten und gereinigten Extraktivstoffes entsprechen 3.35 millimol bzw. Milligramm-äquivalente Wasserstoff. Legt man den Schwefel als Bestandteil der $-\text{SO}_3 \text{ H}$ Funktionen zugrunde, so errechnen sich 1.08 Milligramm-äquivalente Wasserstoff, d.h. 32.2 % der Wasserstoffionen der Säuren, die in extrahierbaren Algenpolysacchariden von Lessonia Fusca ermittelt wurden, entstammen einem sauren Schwefelsäureester. Die restlichen Anteile, etwa 68 %, entfallen auf Carboxylgruppen. Aus dieser Betrachtung geht hervor, daß bei den untersuchten Braunalgen im Durchschnitt von drei Säurefunktionen eine die $-\text{SO}_3 \text{ H}$ Gruppen darstellt. Die Analyse von Alkaloidsalzen, z.B. der Atropinverbindung der Säure der Braunalge Laminaria Spec.

sowie des Codeinderivates der aus Macrocystis Pyrifera isolierten Säure, bestätigt durch das ermittelte Verhältnis des basischen Stickstoffs zu Schwefel im Prinzip diese Verhältnisse. Es war überraschend, daß bei Braunalgen ein so hoher Anteil an aciden Gruppen in Form der Schwefelsäureester vorliegt.

Die Ergebnisse gestatten es, eine Bilanz der Säurefunktion hinsichtlich ihrer Verteilung auf die Monosaccharideinheiten aufzustellen. Zunächst ergibt sich jedoch die grundsätzliche Frage, ob die aciden Gruppen im gleichen Molekül vorhanden sind, oder ob Polysaccharide, die nur Carboxylfunktionen aufweisen, neben solchen vorkommen, die ausschließlich Schwefelsäureester tragen. Der Klärung dienten die Ergebnisse der Papierchromatographie, der Dünnschichtchromatographie, der Papierelektrophorese sowie der Säulenchromatographie.

Es erweist sich als nötig, diese Verfahren jeweils mit dem Ionenaustausch zu kombinieren und die freien Säuren zu verwenden, da die natürlich vorkommenden Salzgemische sowohl auf dem Papier und der Dünnschichtplatte als auch im elektrischen Feld keine so starke Tendenz zur Wanderung zeigen wie die Alginsäuren.

Erfahrungsgemäß ist die Wanderung von organischen Substanzen stark abhängig von funktionellen Gruppen im Molekül und wir sind zu der Annahme berechtigt, daß die Säurefunktionen im starken Maße den RF-Wert beeinflussen. Wir zogen zum Vergleich die dem Kaltcarrageen zugrunde liegende Säure heran. Ihr RF-Wert entspricht dem der Inhaltstoffe der Braunalgen und auch dem des einen von Fucus vesiculosus. Es ist also unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, in den Braunalgen, abgesehen von Fucus vesiculosus, zwei Inhaltstoffe aufzufindig zu machen, die möglicherweise auch unterschiedliche Säurefunktionen tragen könnten. Im wesentlichen bestätigen die Ergebnisse dünnschichtchromatographischer Untersuchungen die Erkenntnisse, die uns die Papierchromatographie vermittelt.

Bei den papierelektrophoretischen Untersuchungen zeigt sich eine besonders starke Abhängigkeit der Wanderung von den funktionellen Gruppen der Algenpolysaccharide. Es gelangte vergleichsweise auch die nur Carboxylfunktionen aufweisende Pektinsäure zur Anwendung. Die Säuren, die Fucus vesiculosus enthält, werden deutlich getrennt in eine Fraktion, die sich wie die carboxylgruppenhaltige Pektinsäure verhält, und eine solche, welche die gleiche Tendenz zur Wanderung im elektrophoretischen Feld aufweist wie die Carrageensäuren mit ihren $-SO_3H$ Funktionen.

Mit diesen Ergebnissen ist zwar bewiesen, daß in Fucus vesiculosus zwei trennbare Algenpolysaccharide auffindbar sind, von denen das eine schwefelhaltige acide Gruppen aufweist, es ist jedoch noch nicht hinreichend unter Beweis gestellt, daß Säurefunktionen in beiden Polysacchariden vorhanden sind. Der Klärung dieser Frage diene schließlich ein Säulenadsorptionsverfahren: Die vergleichsweise untersuchte Säure, die dem Kaltcarrageenin zu Grunde liegt, ergibt bei der gewählten Versuchsanordnung und Eintragen der Filtrationswerte in ein Koordinatensystem eine verhältnismäßig steil aufsteigende und ebenso wieder abfallende Kurve, die auf die Anwesenheit einer einzigen Substanz mit einheitlichen aciden Gruppen hindeutet. Bereits bei der Verwendung eines Ganzextraktes, der die Kalt- und die Warmfraktion enthält, zeigt sich ein anderes Bild (S. 19): Hier ist deutlich erkennbar, daß es sich um zwei verschiedene Polysaccharide, die Säurefunktionen tragen, handelt, die sich durch ihre Sorption an Cellulose unterscheiden und demzufolge nacheinander im Eluat erscheinen. Die Kurven überschneiden sich zwar etwas, jedoch sind deutlich zwei Peaks zu erkennen. Interessant ist das Ergebnis der Untersuchungen der hier in Frage stehenden Säuren, die Fucus vesiculosus enthält. Es gelingt mit Hilfe des Säureabsorptionsverfahrens eine ein-

deutige Trennung zweier Fraktionen, die beide acide Gruppen tragen. In der ersten, schwefelfreien Fraktion sind die Säureeigenschaften der Polysaccharidsäure allein auf die Anwesenheit von Carboxylgruppen zurückzuführen, in der zweiten Fraktion liegt dagegen ein Polysaccharid mit $-SO_3H$ Funktionen vor. Für die unterschiedliche Sorption an Cellulose ist nicht nur die eine oder andere acide Gruppe verantwortlich zu machen, sondern auch der Gesamtbau des Moleküls. Gerade die bereits erwähnte Möglichkeit der Trennung von Säuren des Gesamtextraktes von Carrageen, die die gleiche funktionelle Gruppe tragen, sich jedoch durch ihre sonstige Struktur voneinander unterscheiden, indem die eine linear und die andere verzweigt-kettig gebaut ist, deutet auf einen großen Einfluß der Polysaccharidstruktur hin.

Da z.B. bei Laminaria spec. und Macrocystis Pyrifera festgestellt wurde, daß die Säurefunktionen auf nicht voneinander trennbaren Polysacchariden sitzen, erhebt sich die Frage, ob jede Monosaccharideinheit eine saure Gruppe trägt, oder ob auf manche mehrere entfallen. Auf Grund der Analyse der natürlich vorkommenden Salzgemische sind wir dazu berechtigt, für den Kationenanteil ein durchschnittliches Atomgewicht von 35 einzusetzen. Als ebenfalls durchschnittliches Molekulargewicht einer Monosaccharideinheit errechnen wir demzufolge 240 g. Ihm entspricht eine Menge von 1.32 g sauren Wasserstoffs. Es entfallen also 1.30 acide Gruppen auf je eine Monosaccharideinheit, das heißt jeder dritte bis vierte Molekülbaustein der Braunalgenpolysaccharide trägt zwei acide Gruppen. Hierbei ist vorausgesetzt worden, daß es keine Polysaccharideinheiten ohne Säurefunktion gibt.

Es ist auffallend, daß das erwähnte Atropin-Salz nicht das Verhältnis N zu S = 3 zu 1, wie es auf Grund theoretischer Erwägungen der Fall sein müßte, aufweist. Einen Grund hier-

für kann man darin sehen, daß sterische Behinderungen dadurch gegeben sind, weil zwei acide Gruppen verhältnismäßig eng beieinander sind.

Schließlich erweist sich die Infrarot-Spektrophotometrie im Dienste der Aufklärung des chemischen Aufbaues der hier in Frage stehenden Algenpolysaccharide als wichtiges Hilfsmittel. Sowohl die $-SO_3$ H-Funktion als auch die Carboxylgruppe lassen sich in den Spektren nachweisen: Die Schwefel-Sauerstoff-Doppelbindung des Sulfatrestes gibt sich durch eine Absorption im Bereiche von 1240 cm^{-1} zu erkennen und die Schwefelsäureester-Gruppierung, also die Bindung C-O-S, durch eine solche bei 820 cm^{-1} bis 840 cm^{-1} . Die Carboxylgruppe ist durch eine Absorption in den Bereichen 1400 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} gekennzeichnet.

Bei den beiden Carrageeninen sind die S = O Bindung sowie die Schwefelsäureesterbindung gut feststellbar, während im Bereich der Absorption, die durch Carboxylgruppen bedingt ist, nicht einmal eine Andeutung zu beobachten ist. Bei Laminaria Spec., Lessonia Fusca, Macrocystis Pyrifera und Fucus Vesiculosus sind die Merkmale der $-SO_3$ H-Funktion ebenfalls gut zu erkennen, besonders bei Fucus vesiculosus. Daneben zeigen die genannten Braunalgen deutliche Absorptionsmaxima in den Bereichen, welche die gleichzeitige Anwesenheit von Carboxylfunktionen unter Beweis stellen.

Außer den für die Säurefunktionen charakteristischen Absorptionsmaxima zeigt das Infrarotspektrum der hier untersuchten Rhodophyceen und Phaeophyceen auch sonstige, durch diese Verbindungen bedingte Merkmale, z.B. die Absorption im Bereich von 1050 cm^{-1} , die auf die Gruppierungen Kohlenstoff - Sauerstoff und Kohlenstoff - Sauerstoff - Wasserstoff und im Bereich von 3400 cm^{-1} , die auf Hydroxylgruppen zurückzuführen sind. Ausnahmslos sind die Infrarot-

spektren der untersuchten Algenpolysaccharide durch die beiden letztgenannten Absorptionsmaxima gekennzeichnet. Nicht ganz erklärt ist das Auftreten einer Absorptionsbande bei etwa 1640 cm^{-1} im Falle des Carrageenins. Wahrscheinlich ist hier die Deutung von ORR (47) zutreffend, daß sie auf einen geringen Wassergehalt zurückzuführen ist und nicht auf die Algenpolysaccharide selbst. Bekanntlich ist es außerordentlich schwer, ohne Zersetzung diese Stoffe in nahezu wasserfreiem Zustand zu gewinnen.

Als Polysaccharidschwefelsäureester weisen, wie unsere Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen lehren, die Inhaltstoffe der Algen eine chemische Verwandtschaft zum Heparin auf, das ebenfalls zu dieser Klasse von Körpern zählt.

Man bezeichnet Stoffe, die eine Heparinwirkung besitzen, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie die Blutgerinnung verzögern, als Heparinoide. Ihre gerinnungshemmende Wirkung ist von der Anzahl der Schwefelsäurereste und dem Polymerisationsgrad abhängig. Heparin unterscheidet sich von den Algeninhaltsstoffen durch einen Gehalt an etwa 3 % Stickstoff, dem jedoch im Zusammenhang mit der Verzögerung der Blutgerinnung keine ausschlaggebende Bedeutung zugemessen wird. Es ist eine Anzahl von Heparinoiden bekannt geworden, die stickstoff-frei sind.

Untersuchungen von GÜVEN und AKTIN ergaben bei den Algen Cystoseira barbata, Polysiphonia denudata und Corallina granifera, die an der türkischen Küste gesammelt wurden, keine antikoagulierende Aktivität (25).

ELSEMER (23, 24) beobachtete auch einen starken Einfluß von Jahreszeit, Entwicklungsstadium und Standort. Jahreszeitlich bedingte Schwankungen im Mineralstoffgehalt und Unterschiede hinsichtlich einzelner Kohlenhydratbausteine, stellte LUNDE (40) bei Laminaria digitata fest.

Heparin und Heparinoide hemmen einige Enzymreaktionen in charakteristischer Weise. Die von uns aus Chondrus crispus, Laminaria Spec., Fucus vesiculosus, Lessonia fusca und Macrocystis Pyrifera dargestellten Algenpolysaccharide besitzen durchweg eine, wenn auch recht unterschiedliche, Heparinwirkung, die sich in einer Hemmung der Aktivität der Ribonuclease zu erkennen gibt.

Es ist auffällig, daß keine strenge Beziehung zwischen Schwefelgehalt bzw. der Anzahl der ihm entsprechenden SO_3H Funktionen der Phykokolloiden und der Hemmung der Blutgerinnung besteht. Offensichtlich hängt die heparinoide Wirkung stark vom sonstigen Molekülaufbau ab.

Wir wandten schließlich der Frage, ob und unter welchen Bedingungen die acide Gruppe $-\text{SO}_3\text{H}$ unter physiologischen Bedingungen abgespalten wird, große Aufmerksamkeit zu.

Bei unseren in vitro-Versuchen stellen wir einen guten Abbau der Schwefelsäureester durch gereinigte Schweiniere-Sulfatase fest. Es ist jedoch eine gewisse Differenz, die offensichtlich durch die verschiedenen Substrate bedingt ist, zu verzeichnen.

Besonders interessant erscheint uns das Verhalten der Polysaccharidschwefelsäureester gegenüber menschlichem Duodenalsaft. Die entsprechenden Versuche führen zu der Erkenntnis, daß die Polysaccharidschwefelsäureester der Algen zum hohen Anteil gespalten werden.

Den Abschluß unserer Untersuchungen stellt ein Selbstversuch dar. Nach Verzehren von 10 g Carrageen, die in gepulverter Form mit Wasser in der Wärme zu einem Brei verarbeitet wurden, gelangten Proben des Harnes zur Untersuchung. Es ist bekannt, daß der menschliche Körper den aufgenommenen Schwefel zum größten Teil im Harn als Sulfation oder in organischer Bindungsform ausscheidet. In den sog. Ätherschwefelsäuren des Harnes liegen Phenole, Indoxyl und andere Stoffe gebunden an Schwefelsäure vor. Normalerweise beträgt das Verhältnis von "anorganischer Schwefelsäure" zu "Ätherschwefelsäure" 10 zu 1. Daneben enthält der Harn noch Schwefel als sog. Neutralschwefel. Unter diese Bezeichnung fallen verschiedene organische Schwefelverbindungen wie Sulfosäuren, Sulfhydrylverbindungen, Mercaptane

usw. Die Tagesmenge des ausgeschiedenen Schwefels beträgt 2.0 bis 2.5 g bei einer durchschnittlichen Tagesmenge von 1500 ml. Der Verzehr von 10 g Carrageen führt zu keiner signifikanten Beeinflussung der Menge des Harn-Schwefels. Offenbar wird ein großer Anteil der schwefelhaltigen Phykokolloide mit dem Kot unverändert ausgeschieden. Besonders wichtig erscheint die Feststellung, daß im Verlaufe eines Tages keine Verschiebung von anorganischem Sulfat zu Ester-Sulfat stattfindet. Das Verhältnis beträgt hier 19.8 zu 1. Es liegt damit sogar noch mehr in Richtung des anorganischen Sulfats verschoben als es dem in der Literatur beschriebenen Durchschnitt entsprechen würde.

D.

VERSUCHSTEIL

I. Beschreibung des Ausgangsmaterials

a) Rotalgen:

Chondrus crispus: Der Thallus ist aufrecht, etwa 15 cm hoch, flach, fächerförmig, wiederholt gegabelt und an den Rändern niedrig. Die Farbe ist rotviolett bei der unbenancelten und gelblich bei der gebleichten Sorte.

Gigartina stellata, asicularis, spec. und chauvinii:

Diese vier Algen unterscheiden sich in Form und Größe wenig voneinander. Der Thallus ist aufrecht, etwa 30 - 40 cm hoch, blattartig flach und mehr oder weniger verzweigt, der Stiel rund. Die Farbe von G. stellata ist braunschwarz, von G. asicularis rötlichbraun, von G. chauvinii sowie G. spec. grau.

b) Braunalgen:

Lessonia fusca: Der Stiel ist dick und endet in großen lanzettlichen blattähnlichen Gebilden. Die Pflanze hat eine braunschwarze Farbe und mißt etwa 50 cm.

Laminaria spec.: Der gestielte Thallus weist eine grünliche Farbe und eine ganzrandige sowie lineare Struktur auf und ist etwa 1 m lang.

Macrocystis pyrifera: Am etwa 1 cm dicken Stiel sitzen lanzettliche Thalluslappen, die 1 m lang sind und am Grunde eine birnenförmige Schwimmblase tragen.

Fucus vesiculosus: Der lederartige Thallus ist vielfach gegabelt, ganzrandig, etwa 40 cm lang und weist eine ausgeprägte Mittelrippe auf. An beiden Seiten der Mittelrippe befinden sich Schwimmblasen, die meist paarweise angeordnet

sind. Die Alge hat eine bräunliche bis dunkelolivgrüne Farbe und ist büschelig aufgebaut.

II. Isolierung und Reindarstellung der Alginate

Die Algen werden zum Zwecke des Entsalzens schnell unter fließendem destilliertem Wasser mehrmals gewaschen und nach 10 stündigem Trocknen im Vakuum-Trockenschrank bei einer Temperatur von 25° C, im Tourmix fein zermahlen. Die weitere Verarbeitung erfolgt nach der Vorschrift, die bei der Herstellung des Carrageen-Heißextraktes beschrieben ist.

III. Isolierung der Carrageenine

Zur Bereitung des Kaltexttraktes werden 20 g des fein pulverisierten Carrageens mit 1 Liter destillierten Wassers 24 Stunden bei 20° C im Schüttelthermostat extrahiert und die gelösten Schleimstoffe vom Rückstand durch Zentrifugieren getrennt. Die wässrige Lösung läßt man unter ständigem Rühren in ca. 2 Liter Äthylalkohol (96 %) einfließen. Hierbei fallen die Schleimstoffe aus, die man mehrmals mit Alkohol wäscht: Lösen und Ausfällen werden erforderlichenfalls wiederholt.

Der Heißextrakt des Carrageens wird aus dem bei der kaltextraktion verbleibenden Rückstand gewonnen. Die Extraktion erfolgt nach völliger Entfernung des kaltwasserlöslichen Anteils innerhalb einer Stunde auf dem siedenden Wasserbad. Die gelösten Schleimstoffe werden von den ungelösten Zellulosebestandteilen abzentrifugiert und wie beim

kaltextrakt beschrieben, weiterbearbeitet. Das Ausfällen der Schleimstoffe mit absolutem Alkohol ergibt nach unserer Erfahrung bessere Ausbeuten als sie bei Verwendung anderer Fällungsmittel z.B. Chloroform / Äthanol (1 : 1) und Äther / Äthanol (1 : 1) resultieren.

Die Gewinnung der Trockensubstanz erfolgt in einer Gefriertrocknungsanlage der Firma WKF - Modell L 2. Die Jarrageenate weisen eine hornartige spröde Beschaffenheit auf.

IV. Darstellung der freien Säuren durch Ionenaustausch

2 g der isolierten Phykokolloide werden in 200 ml destillierten Wassers gelöst. Diese Lösung läßt man durch eine Säule von 25 cm Länge und 4 cm Durchmesser laufen, die mit Amberlite IR - 120 in der H - Form gefüllt ist. Zur quantitativen Gewinnung der freien Säuren ist eine Menge von 300 ml Waschflüssigkeit erforderlich.

V. Analytisch-chemische und physikalisch-chemische Verfahren

1. Schwefelbestimmungen:

a) Gewichtsanalytisch:

Aufschluß mit Natriumperoxyd und Äthylenglykol in der IKA-Universal-Bombe nach Wurzschnitt (1). Das gebildete Sulfat wird als BaSO_4 gefällt und gewogen.

- b) Maßanalytisch (indirekt als Bestandteil der Säurefunktion - $\text{SO}_3 \text{ H}$):

Acidimetrische Bestimmung der freien Säuren im Filtrat, das über den Kationenaustauscher gelaufen ist, mit 0.1 n Kalilauge und Methylorange als Indikator.

2. Stickstoffbestimmung:

Aufschluß und maßanalytische Bestimmung des Ammoniaks in der üblichen Weise nach KJELDAHL (10).

3. P_H -Messungen:

Verwendetes Gerät: P_H -Meßgerät der Firma J. Pusl.
Die Messungen werden mit einer kombinierten Glaselektrode vorgenommen. Vor dem Ablesen des P_H -Wertes muß die Elektrode einige Minuten lang in die Gellösungen eingetaucht werden.

4. Papierchromatographische Untersuchungen: (18)

a) Darstellung der Säuren (7)

Herstellung der freien Säuren durch Ionenaustausch wie unter IV beschrieben.

Fließmittel: n- Butanol/Benzylalkohol/Ameisensäure/
Wasser im Verhältnis 7/7/1/2.

Fließrichtung: Absteigend.

Laufzeit: 20 Stunden.

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b.

Entwickler: Bromkresolgrünlösung.

b) Darstellung von Heparin und Algenheparinoiden: (3)

Untersuchungsmaterial: 1) Heparin U.S.P. XVI

- 2) Natürlich vorkommendes Salzgemisch der Pheophyceen- und Rhodophyceen-mucopolysaccharide.

Fließmittel: Mischung aus 30 Vol.-Teilen n- Propanol,
70 Vol.-Teilen destilliertem Wasser.

Fließrichtung: Absteigend.

Laufzeit: 20 Stunden.

Papier: Schleicher & Schüll 2045 b.

Entwickler: Toluidinblaulösung (2).

5. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen:
Darstellung der Säuren:

Herstellung der freien Säuren durch Ionenaustausch wie unter IV beschrieben.

Absorptionsmittel: Cellulosepulver, Nagel & Co.

Fließmittel: n- Butanol/Benzylalkohol/Ameisensäure/
Wasser im Verhältnis 7/7/1/2.

Laufzeit: 3 Stunden.

Entwickler: Bromkresolgrünlösung.

6. Papierelektrophoretische Untersuchungen:

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen sind in dem Elphor- H Gerät nach W. Grassmann und K. Hannig durchgeführt worden.

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b.

Elektrophoresezeit: 3 Stunden.

Puffer: Essigsäure - Acetat Puffer PH. 3.5 und Borat
Puffer PH. 8.0.

Die Anfärbung erfolgt mit einer Bromkresolgrünlösung.

7. Säulenchromatographische Untersuchungen:

Herstellung der freien Säuren durch Ionenaustausch wie unter IV beschrieben.

Sorptionsmittel: Cellulosepulver, Nagel & Co. in einer
Säule von 25 cm Länge und 4 cm Durchmesser.

Untersuchung des Eluats: in Fraktionen von 2 ml. Titration mittels 0.1 n NaOH.

Indikator: Methylorange.

VI. Darstellung der Salze organischer Basen

Die mittels Ionenaustausches erhaltene Lösung der Säuren wird im Meßkolben auf 500 ml aufgefüllt. In 20 ml hiervon erfolgt die Bestimmung der vorhandenen Polysaccharidsäure. Aus dem Verbrauch an 0.1 n NaOH berechnet man die für die Umsetzung der restlichen 480 ml Säure benötigte Menge an Base. Die erhaltene Salzlösung wird eingeeengt und der Rückstand im Vakuumtrockenschrank bei 25° C getrocknet. Nach der Reinigung werden die Salze durch Ermittlung des Stickstoffes und des Schwefels charakterisiert. (1a, 2)

Atropin-Alginat

Das Salz der Heißalginsäure:

Titration: 20 ml Alginsäurelösung (*Laminaria spec.*) verbrauchen 1.95 ml 0.1 n NaOH.

Berechnete Menge Atropin = 1.41 g / 480 ml.

Umsetzung: Allmähliches Zusetzen von 1.41 g Atropin, gelöst in 50 ml Äthanol zur Alginsäurelösung unter starkem Rühren.

Reinigung: Entfernen des Alkohols im Vakuum. Perforation der wässrigen Alginatlösung während 6 Stunden mit Chloroform. Einengen und Trocknen im Vakuum bei 25° C, Pulverisieren und zweistündiges Digerieren mit Äthanol.

Ausbeute: 2.6 g einer schwachbraungelblichen, schellackähnlichen Substanz, die beim Zerreiben ein braunes Pulver ergibt.

Codein-Alginat

- Titration: 20 ml Alginsäure/^{Lösung}(*Macrocystis pyrifera*) verbrauchen 2.12 ml 0.1 n NaOH.
Berechnete Menge Codein = 1.68 g / 480 ml.
- Umsetzung: Allmähliches Zusetzen von 1.68 g Codein, gelöst in 50 ml Äthanol zur Alginsäurelösung unter starkem Rühren.
- Reinigung: Entfernen des Alkohols im Vakuum. Perforation der wässrigen Alginatlösung während 7 bis 8 Stunden mit Äther. Einengen und Trocknen im Vakuum bei 25° C, Pulverisieren und zweistündiges Digerieren mit Äther.
- Ausbeute: 2.2 g einer gelblichen schuppenförmigen Substanz, die beim Zerreiben ein gelbliches Pulver ergibt.

VII. Versuchsanordnung bei der Aufnahme der Infrarotspektren

Die verschiedenen Rhodophyceen- und Phaeophyceen-Phykolloide werden mit Kaliumbromid fein verrieben, gepreßt und als Tablette für die Messung benutzt. Zur Anfertigung der Spektren wurde ein Beckmann - Infrarot - Spektrograph Typ IR 7 benutzt.

VIII. Bestimmung der heparinoiden Wirkungen

Herstellung der Lösungen:

- 1) Acetatpuffer (PH = 5.0)
- 2) Ribonucleat: 0.2 g Na-Ribonucleat in 100 ml
Acetat-Puffer.
- 3) Ribonuclease "RNase":
 - a) 5 mg kristalline Pankreas-Ribonuclease in
100 ml bidestillierten Wassers.
 - b) Diese Lösung unmittelbar vor Gebrauch mit bi-
destilliertem Wasser 1 : 5 verdünnen.
- 4) Heparin-Standardlösung:
Handelspräparat (Thrombopnob p.i.) mit bidestillier-
tem Wasser 1 : 5000 verdünnen.
- 5) Prüflösung:
Natürlich vorkommendes Salzgemisch der Phaeophyceen-
und Rhodophyceen-Phykokolloide.

Verfahren: Meßstrahlung: 300 / μ m
 Meßvolumen: 2.0 ml.

Versuchsansatz: Wässriger Prüflösung 1 % : 0.5 ml
 bidest. Wasser : 0.5 ml
 "RNase" Lösung : 0.5 ml
 Ribonucleat Lösung: 0.5 ml

Vergleichsansatz: Wässrige Heparinlösung 1 % : 0.5 ml
 bidest. Wasser : 0.5 ml
 "RNase" Lösung : 0.5 ml
 Ribonucleat Lösung : 0.5 ml.

Die Extinktion wird in Abständen von 1 Minute abgelesen.
Die Extinktionsabnahme von 0.07 bei Heparin - das als Be-
zugssubstanz dient - wird als 100 % betrachtet.

IX. Reinigung von Algenpolysaccharidschwefelsäure-
estern für die enzymatischen Untersuchungen

Der 1 %igen wässrigen Lösung (40 ml entsprechend 0.4 g Carrageenin) der Polysaccharidschwefelsäureester (Carrageenine) wird solange 0.5 %ige wässrige Lösung von 5 - Aminoacridin-hydrochlorid zugefügt, bis keine Fällung mehr entsteht (). Nach Abtrennung des 5 - Aminoacridin-Polysaccharidschwefelsäureester-Komplexes durch Zentrifugieren erfolgen zwecks Reinigung ein wiederholtes Suspendieren in destilliertem Wasser und Zentrifugieren, sowie schließlich das Sammeln auf einem Filter und nachfolgendes mehrmaliges Auswaschen mit destilliertem Wasser. Die Freisetzung des Polysaccharidschwefelsäureesters vollzieht man durch Ausschütteln des noch feuchten Filterrückstandes mit 10 g feuchten Kationenaustauschers (Amberlite IR - H - Form) und 200 ml Wasser. Der p_H -Wert der abgetrennten klaren Lösung wird durch Zugabe von Kalilauge auf 7.6 eingestellt. Man engt die Lösung bis auf ein Volumen von etwa 50 ml im Vacuum bei 35° C ein, schüttet sie unter Rühren in die dreifache Menge absoluten Äthanol und läßt das Reaktionsgemisch bei 0° für einige Zeit stehen. Die Fällung wird filtriert, zuerst mit Äthanol, dann mit Äther gewaschen und schließlich im Vacuum getrocknet. (39)

X. Gewinnung und Reinigung des Sulfatase - Präparates

Die unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Schweine- niere zerkleinert man mit dem Messer und zerstampft sie zu einem völlig homogenen Brei (/). Die fein zerriebene Organmasse wird rasch während 10 Minuten mit der 7 fachen Menge frisch destillierten Acetons digeriert. Nach dem Absaugen und Trocknen ist das Pulver noch zweimal mit der dreifachen Menge Aceton während 3 Minuten zu entwässern. Man schwemmt es zuletzt in der dreifachen Menge absolu- ten Äthers auf, und breitet es nach dem Absaugen auf Fil- terpapier aus. Zur Entfernung des vorhandenen Bindegewe- bes wird das Trockenpräparat durch ein Haarsieb mittlerer Feinheit getrieben. Anschließend erfolgt eine einstündige Extraktion mit 0.1 n Ammoniak-Flüssigkeit. Bei Zugabe von 0.2 n Essigsäure bis zum P_H -Wert 5.0 fällt überschüssiges Eiweiß aus dem zentrifugierten Extrakt aus. Es folgt ein 48 stündiges Dialysieren gegen oestilliertes Wasser. Ein Zusatz von Toluol ermöglicht eine längere Haltbarkeit der Enzymlösung bei 4° C. (5)

XI. Methode der indirekten Bestimmung des enzymatisch abgespaltenen Sulfates

Aus dem Reaktionsgemisch (Substrat 10 ml, Enzympräparat 10 ml, Puffer 30 ml, und Wasser 50 ml) werden 10 ml mit einer trockenen Pipette entnommen und in einen Meßkolben von 50 ml übergeführt ($\frac{1}{5}$). Darauf versetzt man mit 15 ml alkalischer Bariumchloridlösung (hergestellt durch Mischen einer Lösung von 1 Teil Ätzbaryt in 15 Teilen Wasser mit einer 10 % Bariumchloridlösung im Verhältnis 2 : 1) und füllt mit Wasser genau bis zur Marke auf. Nach kräftigem Schütteln des Kolbeninhaltes wird durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß filtriert, ein Anteil des Filtrats - 20 ml - mit Salzsäure in einem Becherglas stark angesäuert, und etwa 1 Stunde in lebhaftem Sieden gehalten. Das Ba-Sulfat fällt nach erneutem Zusatz obiger alkalischer Bariumchloridlösung in grob kristalliner Form aus und kann leicht filtriert und zur Wägung gebracht werden. Auf diese Weise ist unmittelbar nach Ansatz des Versuches der Gesamtgehalt der Lösung an organisch gebundener Schwefelsäure ermittelt. Weitere Schwefelbestimmungen erfolgen nach verschiedenen Einwirkungszeiten des Enzympräparates.

Die Differenz zwischen dem Anfangswert und dem später festgestellten Gehalt an Ätherschwefel entspricht der enzymatischen abgespaltenen Menge anorganischen Sulfats. (5)

Puffer: Ba-Acetat $P_H = 5.0$.

XII. Bestimmung der Schwefelbindungen im Harn

I. Anorganisches Sulfat:

25 ml filtrierten Harns werden tropfenweise mit 25 %iger Salzsäure versetzt bis Kongopapier deutlich blau gefärbt ist. Darauf fügt man 100 ml Benzidinlösung zu, schüttelt um und läßt einige Minuten stehen. Es fällt ein Niederschlag aus, der filtriert und mit benzidingesättigtem Wasser gewaschen wird. Nun erhitzt man den Niederschlag samt Filter sowie 20 - 30 ml Wasser zum Sieden, und titriert nach dem Abkühlen mit 0.1 n Kalilauge gegen Phenolphthalein bis zur Rotfärbung.

II. Verestertes Sulfat:

Die "gepaarten Schwefelsäuren" werden zunächst hydrolytisch gespalten, indem man 25 ml Harn mit 20 ml verdünnter Salzsäure 20 Minuten zum Sieden erhitzt. Die Bestimmung der Gesamtschwefelsäure erfolgt in derselben Weise wie die des anorganischen Sulfats. Die Menge des veresterten Sulfats ergibt sich aus der Differenz zwischen Gesamtsulfat und anorganischem Sulfat.

III. Neutralschwefel:

25 ml Harn werden mit 10 ml 20 %iger Kaliumnitratlösung versetzt. Darauf fügt man rauchende Salpetersäure in der gleichen Menge wie Harn zu und erhitzt die Mischung im Kjeldahlkolben so lange bis ein weißer Rückstand zurückbleibt. Dieser wird in wenig Wasser gelöst, etwas Salzsäure zugegeben und die Lösung zur vollständigen Vertreibung der Salpetersäure zum Sieden erhitzt. Die weitere Bestimmung der gebildeten Schwefelsäure erfolgt wie beim anorganischen Sulfat.

D.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich mit oen Rhodophyceen- und Phaeophyceen-Phykokolloiden als Träger charakteristischer Säurefunktionen, die für deren Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten von ausschlaggebender Bedeutung sind.

Im einzelnen resultieren folgende Ergebnisse:

1. Exakt bestimmte Rotalgen verschiedener Herkunft weisen einen verhältnismäßig konstanten Schwefelgehalt im gesamten pflanzlichen Material und in den daraus isolierten Phykokolloiden auf. An der Mittelmeerküste gesammelte Agaroidophyten sind wesentlich ärmer an Schwefel und Extraktivstoffen als die anderen Rhodophyceen. In allen Fällen liegt der gesamte Schwefel in den rein dargestellten Schleimstoffen als Bestandteil der aciden Gruppe $-\text{SO}_3 \text{ H}$ vor.
2. Bei der Untersuchung einiger Phykokolloide taxonomisch definierter Phaeophyceen wurde wider Erwarten ein beträchtlicher Gehalt an Schwefel ermittelt, der ebenfalls als Bestandteil der Säurefunktion $\text{SO}_3 \text{ H}$ erkannt wurde. Das Verhältnis der beiden aciden Gruppen $-\text{SO}_3 \text{ H}$ und $-\text{COOH}$ zueinander wurde erstmalig für eine Reihe von Braunalgen-Extraktivstoffen festgestellt. Es beträgt im Durchschnitt 1 : 3.
3. Mit Hilfe der Papier- und Dünnschichtchromatographie sowie der Elektrophorese können nicht $\text{SO}_3 \text{ H}$ - und COOH -Gruppen tragende Phaeophyceen-Phykokolloide unterschieden werden. Es wird diese Tatsache so gedeutet, daß sich diese beiden Funktionen an einem Molekül befinden.

Eine Ausnahme macht lediglich *Fucus vesiculosus*. Hier treten deutlich zwei Bestandteile auf, von denen der eine schwefelhaltig ist. Mit Hilfe der Säulenchromatographie konnten eine SO_3H -Gruppen und eine COOH -Gruppen tragende Fraktion getrennt werden.

4. Die Infrarot-Spektren der Rhodophyceen- und Phaeophyceen-Phykokolloide weisen gemeinsame charakteristische Absorptionsmaxima auf, die für die Schwefelsäureester-Gruppierung kennzeichnend sind. Die Phaeophyceen zeigen zusätzlich die für die Carboxylfunktion arteigenen Banden.
5. Bei Phaeophyceen entfallen auf eine Monosaccharideinheit im Durchschnitt 1.30 acide Gruppen.
6. Algenpolysaccharide - auch die der Braunalgen - weisen eine unterschiedliche Hemmung der Aktivität der Ribonuclease auf, die als Charakteristikum für die heparinoide Wirkung herangezogen wird.
7. Bei einem P_H -Optimum von 5.0, das auch den physiologischen Bedingungen entspricht, spaltet tierische Sulfatase, sowie auch menschlichen Duodenalsaft Polysaccharidschwefelsäureester der Algen. Nach peroraler Verabfolgung von Carrageen findet im Verlauf eines Tages keine signifikante Verschiebung von anorganischem Sulfat zu Estersulfat im Harn statt.

F.

LITERATURVERZEICHNIS :

- 1 AUTENRIETH, W. und
O. KELLER Quantitative Chemische Analyse,
9. Aufl. (1954)
- 2 AWE, W. Arzneimittelforschung 7, 715 (1957)
- 3 AWE, W. und
K.D. STÜDEMANN Arzneimittelforschung 6, 349 (1956)
- 4 BARGANT, F. und
B.T. OVERELL Nature (London) 167, 361 (1951)
- 5 BAMANN, E. und
K. MYRBÄCK Die Methoden der Fermentforschung,
Leipzig (1941)
- 6 BAMANN, E. und
E. ULLMANN Chemische Untersuchungen von Arznei-
gemischen, Arzneispezialität
und Giftstoffen, 2. Aufl. Stutt-
gart (1960)
- 7 BECKER, E. Z. Lebensmittel-Unters. und -For-
schung 98, 249 (1954)
- 8 BERINGER, K. Dissertation, Universität München
1958
- 9 BERGLUND, F. und
B. SÖRBO Acta chemica Skand. 13, 2121 (1959)
- 10 BEYTHIEN, A. und
W. DIEMAIR Laboratoriumsbuch für den Lebens-
mittelchemiker, Dresden und Leip-
zig (1957)
- 11 BROWN, F. Nature (London) 167, 441 (1951)
- 12 BUCHMANN, N. und
E. PERCIVAL J.Chem.Soc. (London) 51, 492 (1943)
- 13 BUTLER, M.R. Biochem. J. 28, 795 (1934)
- 14 BUTLER, M.R. Biochem. J. 30, 1338 (1936)
- 15 CHEFTEL, R. und
R. MUNIER Bull.Soc.Chem.Biol. 33, 840 (1951)
- 16 STANFORD, L. Chem. News 47, 254 (1886)
- 17 COOK, W.H. und
R.C. ROSE Biochem.Biophys.Acta 7, 595 (1921)

- 18 CRAMER, F. Papierchromatographie, 4. Aufl.,
Weinheim 1958
- 19 DEWAR, E.T. und Nature (London) 156, 633 (1945)
E. PERCIVAL
- 20 DEWAR, E.T. und J.Chem.Soc. 323, 1622 (1947)
E. PERCIVAL
- 21 DILLON, T. und Biochem.Biophys. Acta 8, 595 (1952)
P. OCOLLA
- 22 DODGSON, K.S. Biochem. J. 78, 312 (1961)
- 23 ELSENER, H. Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem.
252, 196 (1938)
- 24 ELSENER, H. Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem.
246, 244 (1937)
- 25 GÜVEN, K.C. und Botanica Marina, Vol. VII, Hamburg
E. ATKIN (1964)
- 26 HAAS, P. Biochem. J. 15, 469 (1921)
- 27 HAAS, P. Biochem. J. 17, 696 (1923)
- 28 HAAS, P. und Biochem. J. 23, 425 (1929)
B. RUSSEL-WELLS
- 29 HIRST, R. Nature (London) 143, 537 (1939)
- 30 HOAGLAND, H. J.Biol.Chem. 73, 287 (1915)
- 31 HOMMERBERG, Cl. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
200, 69 (1931)
- 32 JAQUE, L.B. Biochem. J. 144, 229 (1942)
- 33 JOHNSTON, R. und J.Chem.Soc. 408, 1994 (1950)
E. PERCIVAL
- 34 JOHNSON, C.H. und Analytic.Chem. 24, 736 (1952)
H. NISHITA
- 35 JONES, W.G. und J.Chem.Soc. 225, 255 (1942)
M.S. PEAT
- 36 LEGNALT, R. und Ind. Eng. Chem. 41, 466 (1949)
C. NIMMO
- 37 LEONARDO, P. und Analyt. Chem. 23, 1709 (1951)
E. SCHIRLEY

- 38 LORPES, I.E. J. Biol. Chem. 176, 267 (1948)
- 39 LLOYD, A.G.,
K. DODGSON und
R. PREICE Biochem. Biophys. Acta 46, 108 (1961)
- 40 LUNDE, G. Angew. Chem. 50, 731 (1937)
- 41 LUX, H. Praktikum der Quant. anorg. Analyse,
3. Aufl. München 1959
- 42 MORIMOTO, K. Biochem. J. 26, 259 (1937)
- 43 NELSON, W. Science, 67, 537 (1928)
- 44 NELSON, W. und
L. CRETCHER J. Biol. Chem. 94, 147 (1931)
- 45 NEPOMUCK, Z. in
BERGMAYER Methoden der enzymatischen Analyse,
Weinheim 1962
- 46 O'NEILL, A. J. Amer. Chem. Soc. 77, 6324 (1955)
- 47 ORR, S.F. Biochem. Biophys. Acta 14, 173 (1954)
- 48 PORTER, W. und
M. BUCH Food Research 16, 338 (1951)
- 49 REINERT, M. und
A. WINTERSTEIN Arch. Internat. Pharmacodyn. Therap.
62, 47 (1937)
- 50 ROTH, H. Microchemica Acta 36, 379 (1951)
- 51 SMITH, D. und
W. COOK Arch. Biochem. Biophys. 45, 252 (1935)
- 52 SPRINGER, R. und
L. MIDDENDORF Archiv der Pharm. 294, 693 (1961)
- 53 TANAKA, S. Biochem. J. 28, 119 (1938)
-

LEBENS LAUF

Am 21. April 1935 wurde ich als Sohn des Obergerichtsrats Taufik A b d e l m e s s i h und seiner Ehefrau Helen, geb. G h a l i, in Tanta, Ägypten geboren. In Kairo besuchte ich ab 1940 die Volksschule sowie das Gymnasium und bestand dort 1952 mein Abitur. Es folgte das Studium der Pharmazie an der Universität Graz, Österreich, das im Oktober 1957 mit der Ernennung zum "Magister der Pharmazie" seinen Abschluß fand.

Von Januar 1958 bis September 1959 leitete ich die "Elafi"-Apotheke in Heliopolis bei Kairo und absolvierte anschließend meinen 18-Monatigen Militärdienst. Vom April 1961 bis zum Beginn der Promotion war ich im wissenschaftlichen Büro der Firma "Bayer" in Kairo tätig.

Vorliegende Dissertation wurde seit April 1962 unter Leitung von Herrn Professor Dr. Rudolf S p r i n g e r am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München durchgeführt.

